

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**TOXICIDADE DE AGROTÓXICOS EM *Melipona*
quadrifasciata anthidioides LEPELETIER, 1836
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

Jefferson Alves dos Santos

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2024**

**TOXICIDADE DE AGROTÓXICOS EM *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

Jefferson Alves dos Santos
Tecnólogo em Agroecologia, IF Baiano - *campus* Uruçuca, 2019

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Agricultura Tropical).

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2024**

FICHA CATALOGRÁFICA

S237t

Santos, Jefferson Alves dos.

Toxicidade de agrotóxicos em *Melipona quadrifasciata* Anthidioides Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae) / Jefferson Alves dos Santos. _ Cruz das Almas, Bahia, 2024. 78f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho.

1.Abelha sem ferrão – Toxicidade. 2.Produtos químicos agrícolas – Substâncias perigosas – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 638.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MESTRADO

**TOXICIDADE DE AGROTÓXICOS EM *Melipona*
quadrifasciata anthidioides LEPELETIER, 1836
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação de
Jefferson Alves dos Santos

Em 16 de fevereiro de 2024

Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinador Interno (Presidente)

Dra. Geni da Silva Sodré
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
Examinadora Interna

Dra. Samira Maria Peixoto Cavalcante da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
Examinadora Externa

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pela oportunidade para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código Financeiro 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processos 406973/2021-0 e 305950/2021-5.

Ao projeto BEESNESS por parte do apoio financeiro para realização desta pesquisa, por meio da Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) – DOI:10.54499/CIRCNA/BRB/0293/201.

Aos professores Dra. Ana Tereza Bittencourt Guimarães e Dr. Nuno Gonçalo de Carvalho Ferreira.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho, pela oportunidade e ensinamentos.

Ao Núcleo de Estudos dos Insetos - INSECTA, pela parceria e por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Grupo de Trabalho de Toxicologia do Núcleo de Pesquisa Insecta, Érika Oliveira da Silva Farias, Erislan Fonseca Santos, Jaíne Santos Rebouças, Joilson Santana Conceição e Maiara Janine Machado Caldas.

Aos meus familiares, amigos e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para construção deste trabalho.

TOXICIDADE DE AGROTÓXICOS EM *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER, 1836 (HYMENOPTERA: APIDAE)

RESUMO GERAL

As abelhas sociais sem ferrão são insetos de ampla distribuição geográfica na região tropical. São de reconhecida importância econômica e ambiental, devido a polinização e a possibilidade de exploração dos produtos de suas colônias. Contudo, a sobrevivência dessas abelhas está ameaçada por conta de diferentes estressores, a exemplo dos desmatamentos, queimadas e particularmente, pelo uso inadequado de agrotóxicos. Neste sentido, estudos sobre os efeitos dos agrotóxicos nas abelhas são importantes e têm revelado que muitos dos produtos utilizados nas lavouras apresentam elevado nível de toxicidade para essas abelhas. Diante desse cenário, o presente estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade de três ingredientes ativos (i.a.) (Lambda-Cialotrina, Triflumizol e Fenpiroximato) para *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Foram testadas diferentes doses e concentrações dos i.a. em três vias de exposição (ingestão, tópica e superfície de contato). Foi avaliada a mortalidade e as variações comportamentais das abelhas nos intervalos de tempo de 1, 6, 12, 24, 48, 72 e 96h. Os resultados evidenciam alta toxicidade do Lambda-Cialotrina para *M. q. anthidioides*. A DL₅₀ do Lambda-Cialotrina foi calculada para as vias de exposição ingestão de alimento contaminado e aplicação tópica em 96 horas de exposição, sendo 0,34 µg/org por ingestão e 0,063 µg/org por aplicação tópica. Na via de exposição por superfície de contato o Lambda-Cialotrina não causou mortalidade significativa em relação aos tratamentos controle, no entanto provocou alterações comportamentais nas abelhas. O Triflumizol e o Fenpiroximato não causaram mortalidade significativa nas abelhas, mas também afetaram o seu comportamento, causando desorientação, dificuldade de locomoção, agitação, paralisia e prostração nas três vias de exposição. Lambda-Cialotrina é altamente tóxico para *M. q. anthidioides*, causando mortalidade significativa e alterações comportamentais evidentes. Já o Triflumizol e Fenpiroximato não apresentaram toxicidade letal, mas afetaram visivelmente o comportamento das abelhas, o que pode representar risco à sobrevivência e desenvolvimento das colônias.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão, Pesticidas, Saúde das abelhas.

**TOXICITY OF PESTICIDES ON *Melipona quadrifasciata anthidioides*
LEPELETIER, 1836 (HYMENOPTERA: APIDAE)**

GENERAL ABSTRACT

Social stingless bees are insects with a wide geographical distribution in the tropical region. They are of recognized economic and environmental importance due to pollination and the possibility of exploiting products from their colonies. However, the survival of these bees is threatened due to different stressors, such as deforestation, wildfires, and particularly, the inappropriate use of pesticides. In this sense, studies on the effects of pesticides on bees are important and have revealed that many of the products used in agriculture have a high level of toxicity for these bees. Given this scenario, the present study aimed to evaluate the toxicity of three active ingredients (a.i.) (Lambda-Cyhalothrin, Triflumizole, and Fenpyroximate) for *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Different doses and concentrations of a.i. were tested in three exposure routes (ingestion, topical, and contact surface). Mortality and behavioral variations of bees were evaluated at time intervals of 1, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h. The results showed high toxicity of Lambda-Cyhalothrin to *M. q. anthidioides*. The LD₅₀ of Lambda-Cyhalothrin was calculated for the exposure routes of contaminated food ingestion and topical application in 96 hours of exposure, being 0.34 µg/org by ingestion and 0.063 µg/org by topical application. In the contact surface exposure route, Lambda-Cyhalothrin did not cause significant mortality compared to control treatments, but it caused behavioral changes in bees. Triflumizole and Fenpyroximate did not cause significant mortality in bees, but they also affected their behavior, causing disorientation, difficulty in locomotion, agitation, paralysis, and prostration in the three exposure routes. Lambda-Cyhalothrin is highly toxic to *M. q. anthidioides*, causing significant mortality and evident behavioral changes. Triflumizole and Fenpyroximate did not exhibit lethal toxicity but visibly affected the behavior of bees, which could represent a risk to the survival and development of colonies.

Keywords: Stingless bees, Pesticides, Bee health.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Recomendações para o controle de pragas e doenças de produtos formulados com os ingredientes ativos Triflumizol, Lambda-Cialotrina e Fenpiroximato em culturas polinizadas por <i>Melipona quadrifasciata</i>	19
Tabela 2. Concentrações de ingrediente ativo testadas em <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> em diferentes vias de exposição.	31
Tabela 3. Descrição das variações comportamentais observadas durante as avaliações da toxicidade do ingrediente ativo nas abelhas.	34
Tabela 4. Percentual de abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> sobreviventes em 96 horas após exposição ao Lambda-Cialotrina por ingestão de alimento contaminado, erro padrão e intervalo de confiança.	39
Tabela 5. Percentual de abelhas campeiras sobreviventes de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> em 96 horas após exposição ao Lambda-Cialotrina por aplicação tópica, erro padrão e intervalo de confiança.	42
Tabela 6. Percentual de abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> sobreviventes em 96 horas após exposição ao Lambda-Cialotrina por superfície de contato contaminada, erro padrão e intervalo de confiança.	44
Tabela 7. Percentual de abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Triflumizol por ingestão de alimento contaminado, erro padrão e intervalo de confiança.	48
Tabela 8. Percentual de abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Triflumizol por contato a superfície contaminada, erro padrão e intervalo de confiança.	50
Tabela 9. Percentual de abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Triflumizol por via tópica, erro padrão e intervalo de confiança.	51
Tabela 10. Percentual de abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Fenpiroximato por ingestão de alimento contaminado, erro padrão e intervalo de confiança.	55
Tabela 11. Percentual de abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Fenpiroximato por aplicação tópica, erro padrão e intervalo de confiança.	57
Tabela 12. Percentual de abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Fenpiroximato por contato a superfície contaminada, erro padrão e intervalo de confiança.	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do Fenpiroximato.....	20
Figura 2. Estrutura molecular de dois isômeros do Lambda-Cialotrina.	21
Figura 3. Estrutura molecular do Triflumizol.	23
Figura 4. Caixa de criação para coleta das abelhas campeiras de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> para bioensaio e divisórias da caixa modelo INPA. ..	28
Figura 5. Gaiola de criação das abelhas para testes toxicológicos..	29
Figura 6. Fluxograma do procedimento de definição das concentrações a serem testadas.....	31
Figura 7. Sequência de diluição e preparo das soluções de i.a e tratamentos controles para testes de toxicidade em três vias de exposição.....	32
Figura 8. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> expostas ao Lambda-Cialotrina por ingestão de alimento contaminado.....	38
Figura 9. Curva de dose-resposta, DL ₅₀ e erro padrão do Lambda-Cialotrina para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> por ingestão de alimento contaminado em 96 horas.	40
Figura 10. Gráfico de Boxplot para o consumo total de alimento por abelha campeira de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> de cada tratamento..	41
Figura 11. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> expostas ao Lambda-Cialotrina por aplicação tópica.	41
Figura 12. Curva de dose-resposta e DL ₅₀ e erro padrão do Lambda-Cialotrina para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> por via de exposição tópica em 96 horas. .	43
Figura 13. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> expostas ao Lambda-Cialotrina por contato com superfície contaminada.....	43
Figura 14. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> exposta ao Triflumizol por ingestão de alimento contaminado.....	48
Figura 15. Gráfico de Boxplot para o consumo total de alimento por abelha campeira de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> de cada tratamento..	49
Figura 16. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> exposta ao Triflumizol por contato a superfície contaminada.	50
Figura 17. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> exposta ao Triflumizol por aplicação tópica.....	52
Figura 18. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> exposta ao Fenpiroximato por ingestão de alimento contaminado.....	55

Figura 19. Gráfico de Boxplot para o consumo total de alimento por abelha de cada tratamento..	56
Figura 20. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> exposta ao Fenpiroximato por aplicação tópica.....	57
Figura 21. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> exposta ao Fenpiroximato por contato a superfície contaminada.....	58

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	12
2.0	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Abelhas sociais sem ferrão	15
2.2	Declínio das populações de abelhas	16
2.3	Agrotóxicos	17
2.4	Métodos de avaliação de toxicidade de agrotóxicos em abelhas	24
2.5	Toxicidade de agrotóxicos em <i>Melipona quadrifasciata</i>	26
3.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Manejo das colônias	28
3.2	Coleta de abelhas	28
3.3	Ingredientes ativos.....	29
3.4	Delineamento experimental	29
3.5	Doses e concentrações testadas.....	30
	3.5.1 Diluição dos ingredientes ativos.....	32
3.6	Vias de exposição.....	33
	3.6.1 Ingestão de Alimento Contaminado	35
	3.6.2 Aplicação Tópica.....	35
	3.6.3 Superfície de Contato Contaminada	35
3.7	Análise e interpretação dos dados.....	36
	3.7.1 Avaliação de sobrevivência.....	36
	3.7.3 Consumo de Alimento.....	37
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1	Lambda-Cialotrina.....	38
4.2	Triflumizol	47
4.3	Fenpiroximato	54
5.0	CONCLUSÕES.....	62
6.0	REFERÊNCIAS	63
7.0	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a liberação de novos agrotóxicos no Brasil alcançou números expressivos, representando mais de 50% da quantidade total de produtos formulados liberados para comercialização (Brasil, 2023). Ao todo, existem mais de três mil formulações de produtos fitossanitários registrados no Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e com isso, o país se destaca como um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo, em termos de quantidade total utilizada, sendo mais de 700 mil toneladas de agrotóxicos utilizados em 2021 (FAO, 2023).

A utilização excessiva, bem como a crescente liberação de agrotóxicos representa uma grave ameaça às abelhas e de forma particular às abelhas sociais sem ferrão (ASSF) (Toledo-Hernández *et al.*, 2022). Evidências científicas têm demonstrado diversos efeitos tóxicos de diferentes agrotóxicos em espécies de abelhas sociais sem ferrão, comprovando o risco que esses estressores representam para as abelhas (Aguiar *et al.*, 2023; Padilha *et al.*, 2020; Piovesan *et al.*, 2020; Prado-Silva *et al.*, 2018; Seide *et al.*, 2018; Tomé *et al.*, 2015).

A avaliação de risco de agrotóxicos visa avaliar o impacto potencial desses produtos em populações de organismos não alvo. Em abelhas, essa avaliação é realizada principalmente em *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, pois essa espécie possui ampla distribuição mundial (Pires; Torezani, 2018). No Brasil, o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) também utiliza *A. mellifera* como organismo modelo para avaliação de risco dos agrotóxicos em insetos não alvo, embora haja incertezas sobre se uma única espécie exótica é o mais adequado para proteger as diversas espécies de abelhas nativas (Cham *et al.*, 2019).

O Brasil possui uma grande diversidade de espécies de abelhas, podendo abrigar mais de três mil espécies (Silva *et al.*, 2015). Destaca-se, em particular, pela maior variedade de abelhas sociais sem ferrão do mundo (Camargo; Pedro, 2013; Pedro, 2014), que são consideradas polinizadoras nativas de grande valor ecológico, com potencialidade para valoração econômica (Imperatriz-Fonseca *et al.*, 2012).

As ASSF possuem eficácia comprovada na polinização de diversas culturas agrícolas como: macieira (Viana *et al.*, 2014); tomateiro (Bartelli; Nogueira-Ferreira, 2014; Silva-Neto *et al.*, 2019); pepineiro (Nicodemo *et al.*, 2013) e morangueiro (Silva *et al.*, 2020). Por tanto, é fundamental considerar essas abelhas nos ensaios de avaliação de risco de agrotóxicos.

Além disso, as abelhas nativas são mais sensíveis ao efeito de agrotóxicos quando comparadas com a *A. mellifera* (Aguiar *et al.*, 2023; Del Sarto *et al.*, 2014; Lourencetti *et al.*, 2023; Piovesan *et al.*, 2020; Tomé *et al.*, 2017). A capacidade de desintoxicação celular, estrutura da cutícula, peso ou tamanho corporal, hábitos de vida, são exemplos de fatores que podem alterar o nível de toxicidade a depender da espécie (Aguiar *et al.*, 2023; Al Nagggar *et al.*, 2022; Brittain; Potts, 2011; Piovesan *et al.*, 2020). Deste modo, a realização de estudos de toxicidade de agrotóxicos em abelhas sociais sem ferrão faz-se necessário para o entendimento do real risco ao qual essas espécies estão expostas (Assis *et al.*, 2022).

Neste sentido, foi criado no Brasil um Grupo Técnico de Trabalho (GTT) vinculado ao IBAMA, com o objetivo de selecionar uma ou mais espécies nativas com potencial para serem usadas como organismos indicadores na avaliação de toxicidade de agrotóxicos em abelhas. O resultado deste GTT culminou na seleção de 12 espécies de abelhas nativas prioritárias, sendo sete de hábito solitário e cinco de hábito social, dentre as quais está a *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836 (Pires; Torezani, 2018).

A preocupação com o impacto dos agrotóxicos nas abelhas tem crescido nos últimos anos. Em áreas extensas de cultivo agrícola, a utilização de agrotóxicos torna-se uma prática comum para o controle das pragas e doenças que possam comprometer a produção. No entanto, é importante considerar os efeitos desses produtos na biodiversidade, especialmente em espécies polinizadoras como as abelhas (Abati *et al.*, 2021; Aguiar *et al.*, 2023; Almeida *et al.*, 2021; Tosi *et al.*, 2022).

Dentre os diversos ingredientes ativos utilizados no controle de pragas e doenças em diferentes culturas agrícolas, encontram-se o Triflumizol (Fungicida), o Lambda-Cialotrina (Inseticida) e o Fenpiroximato (Acaricida). Esses produtos são recomendados para o controle fitossanitário de diferentes organismos prejudiciais às diversas culturas que são amplamente cultivadas em polos frutíferos, como é o caso do Vale do São Francisco. A exemplo dessas culturas, têm-se acerola, manga, melancia e melão, cujas flores podem ser visitadas pela *Melipona quadrifasciata* (Brasil, 2023; Wolowski *et al.*, 2019).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade dos ingredientes ativos (i.a.) Triflumizol, Lambda-Cialotrina e Fenpiroximato para *Melipona quadrifasciata anthidioides*, por três vias de exposição: ingestão de alimento contaminado, aplicação tópica e por contato com superfície contaminada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As abelhas são insetos com importância econômica e ambiental, devido a polinização e a exploração de seus produtos, principalmente nas regiões tropicais (Rader *et al.*, 2013). São também relevantes para a manutenção da biodiversidade vegetal como polinizadores da maioria das plantas com flores (Badowska *et al.*, 2019), por isso são consideradas como os polinizadores mais importantes do planeta (Quazada-Euán *et al.*, 2018).

Estima-se que em torno de 99,8% dos agentes polinizadores bióticos sejam insetos e dentro desse percentual, mais de 70% são abelhas (Giannini *et al.*, 2015a; Montenegro; Simoni, 2021). A polinização realizada pelas abelhas aumenta a qualidade dos frutos, a quantidade e o valor do produto, o que impacta positivamente a economia (Klatt *et al.*, 2014; Montenegro; Simoni, 2021).

As ASSF foram relatadas como polinizadoras de 1.476 gêneros de plantas em 221 famílias em todo o mundo (52% das famílias de angiospermas), com cada espécie visitando em média 31 gêneros de plantas (Bueno *et al.*, 2023). Deste modo, é indiscutível a importância ambiental das abelhas sociais sem ferrão como polinizadoras para a biodiversidade global.

Com relação a produção agrícola, aproximadamente 50% dos cultivos dependem da polinização (Giannini *et al.*, 2015b), sendo que as abelhas estão associadas ao aumento substancial das principais colheitas (Santos *et al.*, 2021). Sabe-se que a maioria das plantações destinadas à alimentação são visitadas por polinizadores, dentre eles as abelhas (Klein *et al.*, 2007), podendo chegar a 80% das plantas utilizadas direta ou indiretamente na produção de alimento (Montenegro; Simoni, 2021).

As ASSF são polinizadoras eficazes de diversas culturas agrícolas, mesmo aquelas que não são nativas de seu continente, como café, goiaba, manga, cajá e tamarindo (Bueno *et al.*, 2023). A utilização de abelhas sociais sem ferrão como polinizadores de culturas agrícolas é uma prática cada vez mais comum, tendo em vista que sua polinização contribui para o aumento da produção de frutas e sementes da maioria das plantas cultivadas comercialmente (Barbosa *et al.*, 2017; Imperatriz-Fonseca; Silva-Nunes, 2010).

2.1 Abelhas sociais sem ferrão

As abelhas sociais sem ferrão ou meliponídeos são insetos sociais que estão dispersos em sua maioria nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (Oliveira *et al.*, 2013). Existem mais de 400 espécies de ASSF descritas em todo o mundo, destas, mais de 300 ocorrem naturalmente no Brasil e estão distribuídas em 32 gêneros (Alves *et al.*, 2021; Camargo; Pedro, 2013). A criação técnica de ASSF é denominada de meliponicultura, uma atividade historicamente desenvolvida pelos povos originários (Kerr *et al.*, 1996; Nogueira-Neto, 1997).

O gênero *Melipona* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini) agrupa cerca de 50 espécies distribuídas na região Neotropical (Camargo; Pedro, 2013). São abelhas de aspecto robusto, de tamanho entre seis e 15 mm, com ninhos sendo encontrados principalmente em ocos de troncos ou galhos de árvores. São facilmente reconhecidos por sua entrada característica constituída de raias salientes feitas de geoprópolis, ficando uma abelha vigia na entrada da maioria das espécies (Alves *et al.*, 2016; Alves *et al.*, 2021; Souza, *et al.*, 2009).

Dentre as espécies de *Melipona* que ocorrem no Brasil, destaca-se a *Melipona quadrifasciata*, que é conhecida popularmente como Mandaçaia. Esta espécie é considerada como politípica com duas subespécies descritas: *M. quadrifasciata quadrifasciata* e *M. quadrifasciata anthidioides*. Ambas são amplamente difundidas e criadas por meliponicultores em diversos estados brasileiros (Camargo; Pedro, 2013; Jaffé *et al.*, 2015; Pedro, 2014).

Pesquisadores têm relatado a importância da *M. quadrifasciata* para a polinização de diversas plantas nativas, podendo representar até 90% das espécies vegetais visitadas por esta abelha em diferentes regiões (Radaeski; Bauermann, 2021; Radaeski *et al.*, 2022). As principais famílias botânicas visitadas pela *M. quadrifasciata*, são: Myrtaceae, Fabaceae, Asteraceae, Solanaceae, Melastomataceae e Mimosaceae (Barth; Freitas; Vanderborght, 2020; Luz *et al.*, 2018; Nascimento *et al.*, 2015; Oliveira-Abreu *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2019; Vieira *et al.*, 2022).

Em relação a polinização de culturas agrícolas, estudos científicos têm elucidado resultados importantes, como: o aumento de massa fresca, comprimento, maior número de sementes, aumento no teor de açúcar e maior taxa de frutificação efetiva em plantas cultivadas comercialmente e polinizadas pelas abelhas mandaçaia, a exemplo da macieira (Viana *et al.*, 2014), tomateiro (Bartelli;

Nogueira-Ferreira, 2014; Silva-Neto *et al.*, 2019) e pimentão (Roselino; Santos; Bego, 2010). Além disso, é considerada polinizadora efetiva de outras culturas, como: abobreira, aceroleira, cafeeiro, goiabeira e urucuzeiro (Giannini *et al.*, 2020; Wolowski *et al.*, 2019).

Apesar da reconhecida importância das abelhas para manutenção da biodiversidade e produção agrícola, esses insetos estão seriamente ameaçados pela utilização excessiva de agrotóxicos, conforme já mencionado anteriormente. Nesse sentido, é essencial proteger e preservar as abelhas e seu habitat, a fim de garantir a continuidade de sua importância econômica e ambiental para as gerações futuras.

2.2 Declínio das populações de abelhas

O declínio das populações de polinizadores tem sido causado, principalmente, pelo uso não sustentável dos ecossistemas para produção agrícola (Cunha; Nóbrega; Júnior, 2014). Entre os principais fatores estão a perda e fragmentação de habitats; utilização excessiva de agrotóxicos; poluição ambiental; introdução de espécies exóticas; disseminação de parasitos e doenças; mudanças climáticas e diminuição da diversidade de recursos (Nath; Singh; Mukherjee, 2023; Potts *et al.*, 2010; Toledo-Hernández *et al.*, 2022).

O declínio nas populações de polinizadoras, em especial as abelhas, é preocupante pois pode levar também a uma diminuição da biodiversidade vegetal (Lima *et al.*, 2016) e por consequência, um desequilíbrio nas condições de vida no planeta (Potts *et al.*, 2016). Um dos principais fatores que causam a diminuição da população de abelhas é a contaminação por agrotóxico, que pode ocorrer de diversas formas, por contato, ingestão de recursos florais, partículas suspensas no ar e na coleta de recursos, como solo, água, própolis e resina (Boyle *et al.*, 2019).

Os prejuízos causados pelos agrotóxicos à população de abelhas vão desde a mortalidade dos indivíduos até alterações morfológicas e fisiológicas, como alteração no tempo de desenvolvimento da larva, diminuição na taxa de respiração, comportamento locomotor e percepção a sacarose (Piovesan *et al.*, 2020; Prado-Silva *et al.*, 2018; Seide *et al.*, 2018).

De acordo com a meta-análise realizada por Tosi *et al.* (2022), os grupos químicos relatados na literatura como os mais tóxicos para as abelhas são os inseticidas sistêmicos neonicotinóides, que possuem maior toxicidade por ingestão, e os piretróides, que têm maior toxicidade por contato. Ainda segundo o mesmo

estudo, os ingredientes ativos que atuam como moduladores alostéricos do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) são os que apresentam maior nível de toxicidade para as abelhas.

Além dos inseticidas, outros grupos de agrotóxicos também apresentaram efeitos tóxicos para abelhas, tais como: herbicidas (Nocelli *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2022; Seide *et al.*, 2018), fungicidas (Almeida *et al.*, 2021; Domingues *et al.*, 2020; Prado *et al.*, 2020; Tomé *et al.*, 2017) e acaricidas (Dahlgren *et al.*, 2012; Johnson *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2022).

Uma exposição combinada a diferentes agrotóxicos, bem como a interação com outros estressores, a exemplo de alterações climáticas e a infraestrutura ecológica da paisagem, podem aumentar o risco que estes produtos causam às abelhas (Potts *et al.*, 2016).

A preocupação é que a diminuição das populações de abelhas possa levar a uma redução da biodiversidade vegetal, o que teria impactos significativos em todo o ecossistema (Lima *et al.*, 2016; Potts *et al.*, 2016). Deste modo, é importante conhecermos os mecanismos de ação dos agrotóxicos e os efeitos letais e subletais que eles podem causar nas abelhas, sobretudo as abelhas nativas (Abati *et al.*, 2021; Tosi *et al.*, 2022).

Portanto, a realização de testes de toxicidade de agrotóxicos em abelhas sociais sem ferrão torna-se essencial para compreender o verdadeiro perigo ao qual as espécies nativas estão sujeitas, dada sua maior sensibilidade aos efeitos dos agrotóxicos quando comparadas às espécies exóticas (Aguar *et al.*, 2023; Del Sarto *et al.*, 2014; Lourencetti *et al.*, 2023).

Dentre as espécies nativas listadas como prioritárias para realização de testes de toxicidade de agrotóxicos, encontra-se a *M. quadrifasciata* (Pires; Torezani, 2018), selecionada devido a vários fatores que a tornam uma espécie relevante. Dentre eles, destacam-se a sua ampla distribuição em diferentes regiões do Brasil, seu papel significativo na polinização de culturas agrícolas e plantas nativas, além da sua importância econômica e socioambiental, uma vez que contribui para a produção de alimentos, manutenção da biodiversidade e geração de renda para os meliponicultores.

2.3 Agrotóxicos

A Lei N° 14.785, de 27 de dezembro de 2023, que dispõe sobre questões

relacionadas aos agrotóxicos, produtos de controle ambiental, produtos técnicos e afins, define o termo agrotóxico como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens ou na proteção de florestas plantadas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Brasil, 2023, cap. I, art. 2, ins. XXVI).

Os agrotóxicos são substâncias químicas utilizadas na agricultura, pecuária ou domicílios, para combater e controlar organismos indesejáveis, podendo matar diretamente o organismo ou controlar seu processo reprodutivo, atuando de modo geral no bloqueio de processos metabólicos vitais para os organismos alvo (Nascimento; Melnyk, 2016).

Estes produtos podem ser organizados em diferentes classes, conforme o organismo ao qual possuem ação de combate, a exemplo dos inseticidas, que possuem ação contra insetos; fungicidas, que atuam no combate a fungos; e acaricidas, que têm ação sobre ácaros (Karam *et al.*, 2015). No entanto, alguns produtos são registrados em mais de uma classe. Podem ser agrupados também em grupos químicos, conforme a semelhança das estruturas moleculares do princípio ativo que o constitui (Mendes *et al.*, 2019).

Dentre os diversos agrotóxicos liberados para comercialização e uso no Brasil, encontram-se os ingredientes ativos (i.a.) Lambda-Cialotrina (Inseticida), Triflumizol (Fungicida) e Fenpiroximato (Acaricida). Esses i.a. são encontrados em formulações comerciais liberadas para uso no controle de pragas e doenças em cultivos agrícolas que são polinizados por *M. quadrifasciata* (Tabela 1).

Tabela 1. Recomendações para o controle de pragas e doenças de produtos formulados com os ingredientes ativos Triflumizol, Lambda-Cialotrina e Fenpiroximato em culturas polinizadas por *Melipona quadrifasciata*.

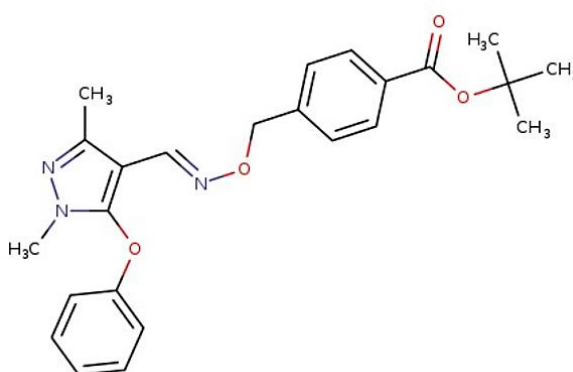
Ingrediente ativo	Culturas	Organismo alvo	Nome comum
Fenpiroximato	Abóbora;Acerola; Café; Manga; Pimentão;Tomate	<i>Tetranychus urticae</i>	Ácaro rajado
	Maçã	<i>Panonychus ulmi</i>	Ácaro da macieira
	Manga	<i>Polyphagotarsonemus latus</i>	Ácaro branco
	Café	<i>Oligonychus ilicis</i>	Ácaro vermelho
		<i>Brevipalpus phoenicis</i>	Ácaro da leprose
Lambda-Cialotrina	Abóbora; Melancia; Melão	<i>Diaphania nitidalis</i>	Broca das cucurbitáceas
	Café	<i>Leucoptera coffeella</i>	Larva minadora
	Manga	<i>Megalopyge lanata</i>	Lagarta-de-fogo; Taturana
	Pimentão; Tomate	<i>Neoleucinodes elegantalis</i>	Broca pequena do tomateiro
	Tomate	<i>Bemisia tabaci</i>	Mosca branca
		<i>Diabrotica speciosa</i>	Vaquinha verde amarela
		<i>Frankliniella schultzei</i>	Tripes
		<i>Helicoverpa armigera</i>	Lagarta-do-algodão
		<i>Helicoverpa zea</i>	Broca grande do tomate
		<i>Myzus persicae</i>	Pulgão verde
		<i>Plutella xylostella</i>	Traça das crucíferas
		<i>Tuta absoluta</i>	Traça do tomateiro
Triflumizol	Maçã	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnose
		<i>Gloeodes pomigena</i>	Fuligem
		<i>Podosphaera leucotricha</i>	Oídio
		<i>Venturia inaequalis</i>	Sarna
	Manga	<i>Oidium mangiferae</i>	Oídio
	Melancia	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Míldio-pulverulento; Oídio
	Melão	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	Antracnose
		<i>Didymella bryoniae</i>	Podridão-amarga
		<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Míldio-pulverulento; Oídio

FONTE: Brasil, 2023.

Além disso, resíduos destes ingredientes ativos foram detectados em produtos das abelhas (Rissato *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2018; Sánchez-Bayo; Goka, 2014), na água (Gama; Oliveira; Cavalcante, 2013) e no solo (Pinheiro; Morais; Silva, 2011), tornando-os uma ameaça potencial à saúde das abelhas.

O Fenpiroximato é um acaricida do grupo químico Pirazol, seu nome químico é tert-butyl 4-[(E)-[(1,3-dimethyl-5-phenoxy-1H-pyrazol-4-yl)methylene]amino]oxy)methyl]benzoate; fórmula bruta $C_{24}H_{27}N_3O_4$ e fórmula estrutural expressa na Figura 1.

Figura 1. Estrutura molecular do Fenpiroximato.



Autor: EFSA, 2016.

Os Pirazóis pertencem à família dos 1,2-azóis, juntamente com os isotiazóis e os isoxazóis. São heterociclos de cinco membros que constituem uma classe de compostos particularmente úteis em síntese orgânica (Godoy Netto *et al.*, 2008; Yerragunta *et al.*, 2014). A presença do núcleo pirazol em diferentes estruturas leva a aplicações diversificadas em diferentes áreas como tecnologia, medicina e agricultura (Karrouchi *et al.*, 2018). Na agricultura os Pirazóis apresentam amplo atividade biológica, tendo compostos voltados para utilização como inseticidas (Fipronil e Tolfenpyrad), acaricida (Tolfenpyrad e Fenpiroximato), fungicida (Fenpirazamina) e herbicida (Pyroxasulfone) (Brasil, 2023).

O Acaricida Fenpiroximato atua como inibidor do Complexo I da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais no sítio NADH-coenzima Q redutase, apresenta maior eficácia contra larvas do que contra outros estágios de vida dos ácaros, atua principalmente por contato e ação estomacal. É um composto considerado de toxicidade moderada para mamíferos. Sintomas característicos de sua intoxicação é o rápido “*knock down*” (efeito instantâneo) e paralisia nos organismos alvo (Lümmen,

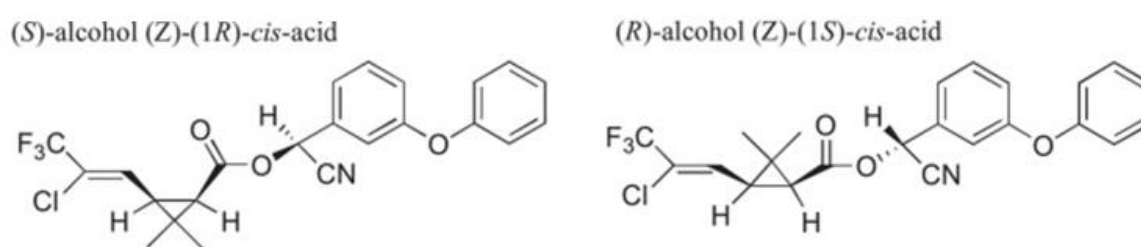
1998; Dekeyser, 2004; EFSA, 2016).

A maior dosagem recomendada pelo fabricante de um produto formulado com Fenpiroximato proporcionou baixa mortalidade em *Apis mellifera*, porém causou efeitos secundários evidentes como alterações na coordenação motora e quando combinado com óleo mineral, causou agitação nas abelhas (Leite *et al.*, 2018). Em outro estudo, a mortalidade causada por outra formulação comercial do Fenpiroximato não ultrapassou 30% na maior concentração testada após 96 horas, resultando em uma CL₅₀ (Concentração Letal 50%) estimada em 25,2ppm para *A. mellifera* por exposição oral (Darwish; Ali; Aly, 2022).

Dahlgren *et al.* (2012) também estudaram a toxicidade do Fenpiroximato para *A. mellifera* e estimaram uma DL₅₀ de 30µg/g.p.c. para operárias e uma DL₅₀ >1.620µg/g.p.c. para rainhas da mesma espécie expostas ao ingrediente ativo por via tópica. Estes estudos demonstram uma baixa toxicidade letal do Fenpiroximato para *A. mellifera*, quando comparado com outros acaricidas testados pelos mesmos autores (Dahlgren *et al.*, 2012; Darwish; Ali; Aly, 2022)

O Lambda-Cialotrina é um inseticida que apresenta fórmula molecular (C₂₃H₁₉ClF₃NO₃), com nome químico: [α-ciano-3-fenoxibenzil-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoro-1-propenil)-2,2-dimetil ciclopropanocarboxilato] e fórmula estrutural expressa na Figura 2.

Figura 2. Estrutura molecular de dois isômeros do Lambda-Cialotrina.



Autor: Li *et al.*, 2014.

Pertencente ao grupo químico Piretróide, possui atuação no sistema nervoso dos insetos, interrompendo a condução nervosa pelo prolongamento da fase aberta dos portões de canais de sódio. Essa ação leva a hiperatividade do sistema nervoso, interrupção na alimentação, perda do controle muscular, paralisia e morte (Li *et al.*, 2014).

Os Piretróides são os derivados sintéticos das piretrinas, que são ésteres tóxicos encontrados em plantas do gênero *Crisantemo*. Agem nos insetos rapidamente causando paralisia imediata e mortalidade, efeito de choque denominado “*Knock down*”. De maneira geral, os Piretróides possuem ação significativa sobre os canais de sódio neural, interferindo na sua abertura e fechamento, prolongando o tempo de entrada de íons Na⁺ para o interior das células (Santos; Areas; Reyes, 2007).

A depender da presença ou ausência de um grupo de ciano (CN) na porção fenoxibenzil, os i.a. do grupo dos Piretróide podem agir de formas diferentes, nos nervos periféricos, causando a Síndrome do Envenenamento ou no sistema nervoso central, induzindo a Síndrome da Coreoatetose (Santos; Areas; Reyes, 2007). Dentre os principais i.a. deste grupo estão o Deltametrina, Permetrina, Cipermetrina e Lambda-Cialotrina.

A toxicidade do Lambda-Cialotrina foi testada em uma espécie de abelha sem ferrão africana (*Hypotrigona ruspolti* (Magretti, 1898)), por meio de uma formulação comercial, em que a dosagem recomendada pelo fabricante causou 100% de mortalidade nas abelhas expostas a superfície de contato contaminada (Abraham *et al.*, 2018).

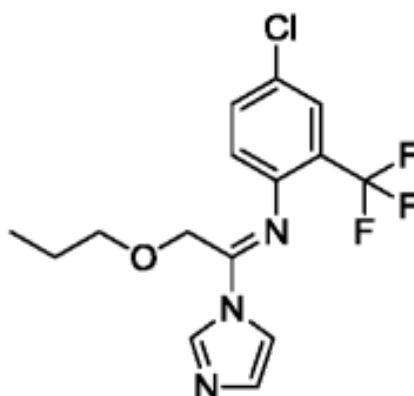
Em outro estudo, a formulação comercial do Lambda-Cialotrina (Karate Zeon® CS), causou mortalidade significativa à espécie de abelha sem ferrão *Partamona helleri* por ingestão, resultando em uma CL₅₀ estimada em 0,043 mg de i.a/L após 72h de exposição. Além disso, esta exposição resultou em danos ao intestino médio e induziu estresse oxidativo em *P. helleri* (Motta *et al.*, 2023).

O efeito tóxico do Lambda-Cialotrina por exposição oral foi observado em *A. mellifera* recém emergidas, a partir de concentrações superiores a 1/4 da CL₅₀ estimada (CL₅₀ 5,9678ppm), reduzindo significativamente a sobrevivência. Além disso, o i.a. causou alterações no comportamento de retorno à colônia, aprendizado olfativo, capacidade de memória e habilidades cognitivas das abelhas (Liao *et al.*, 2018).

O Triflumizol é um fungicida cujo nome químico é ((E)4-cloro- α,α , - trifluoroN-(1-imidazol-1-il-2-propoxietilideno)-o-toluidina), fórmula molecular: (C₁₅H₁₅ClF₃N₃O) e a sua fórmula estrutural é apresentada na Figura 3. Trata-se de um fungicida de amplo espectro do grupo químico Imidazol. Os Azolis são fungicidas sintéticos que se caracterizam por possuir um anel de Imidazol livre ligado por uma ligação C-N a

outros anéis aromáticos. A natureza destes anéis modifica as propriedades físico-químicas, terapêutica e toxicidade de cada i.a. A depender da sua estrutura química, os compostos azóicos são classificados em Triazóis e Imidazóis (Catalán; Montejo, 2006; Zarn; Brüscheweiler; Schlatter, 2003).

Figura 3. Estrutura molecular do Triflumizol.



Autor: Zhu *et al.*, 2014.

O seu mecanismo de ação nos organismos é por meio da inibição da enzima C14-desmetilase, também denominada CYP51. Esta ação bloqueia a conversão do lanosterol em ergosterol causando uma alteração na permeabilidade da membrana das células fúngicas e produção e acúmulo de peróxido de hidrogênio danificando a estrutura das organelas intracelulares dos fungos (Catalán; Montejo, 2006; França *et al.*, 2014; Zarn; Brüscheweiler; Schlatter, 2003).

A ação do Triflumizol nos organismos alvo está direcionada à inibição de enzimas que desempenha um papel importante na conversão de lanosterol em ergosterol, um componente essencial do esterol nas membranas dos fungos e das leveduras (Iwasa *et al.*, 2004; Zarn; Brüscheweiler; Schlatter, 2003; Zhu *et al.*, 2014).

Em outros organismos como os mamíferos, a ação do Triflumizol pode afetar a fertilidade e desenvolvimento dos órgãos reprodutivos de diversas espécies (Zarn; Brüscheweiler; Schlatter, 2003). Além disso, esse composto também pode inibir a CYP450s de insetos (Brattsten; Berger; Dungan, 1994). Em *A. mellifera*, o Triflumizol, testado como sinergista de inseticidas, potencializou o efeito tóxico dos inseticidas Acetamiprid e Tiaclopride por via de exposição tópica, porém não causou mortalidade quando as abelhas foram expostas por superfície de contato (Iwasa *et al.*, 2004).

Entender o impacto dos agrotóxicos nas abelhas é fundamental para compreender o risco que estes produtos oferecem a estes importantes polinizadores. Por meio de testes toxicológicos é possível avaliar os efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas e, assim, compreender os impactos que podem causar ao meio ambiente.

Até o momento não foram identificados estudos científicos que tenham avaliado a toxicidade desses três ingredientes ativos em *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Essa lacuna de conhecimento ressalta a necessidade de investigar os impactos desses produtos químicos nas abelhas sociais sem ferrão, a fim de fornecer informações relevantes para realização de práticas de manejo sustentável e proteção das abelhas nativas.

2.4 Métodos de avaliação de toxicidade de agrotóxicos em abelhas

A avaliação de toxicidade de agrotóxico é um processo sistemático que avalia a probabilidade de um efeito ecológico adverso ocorrer como resultado da exposição a um ou mais agrotóxicos. É útil para a tomada de decisão e ajuda a entender e prever as relações entre um estressor e seus efeitos ecológicos (Cham *et al.*, 2017).

Existem diferentes tipos de testes de avaliação de toxicidade de agrotóxicos em abelhas, dependendo do nível de incerteza e do tipo de produto químico. Os estudos de Nível I são realizados em laboratório e limitados a padrões de uso ao ar livre, enquanto os estudos de Nível II ocorrem em condições de semicampo. Já os estudos de Nível III são realizados em campo completo e são usados para abordar incertezas específicas identificadas em estudos de nível inferior (USEPA, 2014).

Neste sentido, a Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE do inglês - *Organization for Economic Cooperation and Development*) desenvolveu diversas diretrizes para padronizar os testes de toxicidade em abelhas, utilizando como organismo modelo *A. mellifera*. Dentre as diretrizes, destacam-se o teste de toxicidade oral aguda em abelhas adultas (OECD N° 213, 1998a), o teste de toxicidade oral em larvas de abelhas com exposição única (OECD N° 237, 2013), o teste de toxicidade oral crônica em abelhas adultas (OECD N° 245, 2017) e o teste de toxicidade de contato aguda em abelhas adultas (OECD N° 214, 1998b).

A toxicidade referida nesses testes, trata do potencial da substância ou produto de causar efeitos adversos em determinado organismo. Estes testes geram

resultados que servem como parâmetros para avaliar a toxicidade ou efeito observado, sendo o principal a mortalidade, que é dada em CL₅₀ (Concentração Letal 50) ou DL₅₀ (Dose Letal 50), que representam, respectivamente, a concentração ou a dose estimada que está associada com a morte de 50% da população testada (Cham *et al.*, 2017; OECD N° 245, 2017).

Já os testes crônicos, que investigam o efeito da exposição repetida em níveis subletais do estressor, produzem resultados em termos de NOEC/NOAEL (*No Observed Effect Concentration*) ou LOEC/LOAEL (*Lowest observed Effect Concentration*), representando respectivamente o nível ou concentração mais alto em que não há efeitos observados e o nível ou concentração mais baixo em que há algum efeito observado (Cham *et al.*, 2017; OECD N° 245, 2017).

Além destes, outros parâmetros de avaliação da toxicidade de i.a. podem ser tomados com base nos resultados obtidos nos testes toxicológicos, tais como: EC₅₀ (*Effective Concentration Median*), que é a concentração em que 50% dos organismos apresentam algum tipo de efeito; LT₅₀ (*Lethal Time Median*), que é o intervalo de tempo médio em que há a mortalidade de 50% dos organismos testados; NR-LETH, que representa o valor cuja a mortalidade atingiu 100% na concentração mais baixa em menor tempo e NR-ZERO, que representa o valor em que não houve mortalidade (0%) na concentração mais alta no período mais longo de observação (Cham *et al.*, 2017; Duffus, 1993; Gupta, 2018).

Dessa forma, são diversos os parâmetros utilizados para avaliar a toxicidade dos ingredientes ativos. Entretanto, nos estudos de avaliação de toxicidade de i.a. para abelhas, a DL₅₀ é o parâmetro mais utilizado, classificando os produtos químicos em diferentes níveis de toxicidade com base na dose letal mediana encontrada em testes de toxicologia (Tosi *et al.*, 2022).

Neste sentido, Feltron *et al.* (1986) classificaram a toxidade de produtos químicos para abelhas *A. mellifera*, de acordo com a Dose Letal Mediana (DL₅₀) encontrada em testes de toxicologia, sendo classificados como: virtualmente tóxico ou não tóxico (>100 µg/abelha); ligeiramente tóxico (entre 10 e 100 µg/abelha); moderadamente tóxico (entre 1 e 10 µg/abelha); e altamente tóxico (<1,0 µg/abelha).

Para uma avaliação mais precisa da toxicidade de i.a. em abelhas é importante considerar todos os parâmetros em conjunto. No entanto, a avaliação de toxicidade e a maioria das pesquisas se concentram apenas nos efeitos letais, ignorando os efeitos subletais e combinados que também devem ser considerados

(Tosi *et al.*, 2022).

Os efeitos subletais comumente relatados em estudos de toxicologia com abelhas foram classificados por Tosi *et al.* (2022), em três grupos: comportamento (atividade, coordenação motora e alimentação); cognitivo (aprendizagem e/ou memória, comunicação e orientação); e fisiológico (bioquímico, neurofisiológico, desenvolvimento corporal, termorregulação, imunidade, reprodução e atividade muscular).

2.5 Toxicidade de agrotóxicos em *Melipona quadrifasciata*

A toxidade de agrotóxicos para as abelhas sociais sem ferrão já foi testada e comprovada em diferentes estudos. Além disso, observa-se que a toxicidade varia a depender da via de exposição em que o teste é realizado (Del Sarto *et al.*, 2014; Padilha *et al.*, 2020; Piovesan *et al.*, 2020; Toledo-Hernández *et al.*, 2022). Bioensaios demonstraram que inseticidas como Abamectina, Deltametrina, Metamidofós, Imidacloprido e Spinosad são altamente tóxicos para *M. quadrifasciata* quando expostas a alimentos contaminados (Del Sarto *et al.*, 2014; Tomé *et al.*, 2015).

Além desses produtos, o herbicida Glifosato e o inseticida Imidacloprido foram letais para larvas de *M. quadrifasciata* em doses de campo (Seide *et al.*, 2018). Da mesma forma, os bioinseticidas Azadrachtina e Spinosad reduziram significativamente a taxa de sobrevivência das larvas e afetaram a massa corporal das pupas, além de aumentar a quantidade de adultos de *M. quadrifasciata* com alguma deformação (Barbosa *et al.*, 2015).

Avaliando doses residuais de Imidacloprido em *M. quadrifasciata*, Brito *et al.* (2020) observaram redução significativamente no consumo alimentar. Além disso, a contaminação pelo inseticida também reduziu a distância percorrida pelas abelhas, apesar de não ter influenciado na taxa de mortalidade das abelhas.

A ingestão crônica de Imidacloprido por larvas de *M. quadrifasciata* foi avaliada por Tomé *et al.* (2012). Os resultados evidenciaram alta toxicidade do inseticida, impedindo o desenvolvimento das larvas até o estágio de pupa. Além disso, doses subletais promoveram alteração do comportamento de caminhada após quatro dias de emergência das abelhas adultas e comprometeram o desenvolvimento dos corpos de cogumelo no cérebro, que são responsáveis pela integração de informações multissensoriais, memória e aprendizado das abelhas.

Ao avaliar a capacidade de aprendizagem e memória das espécies *M. quadrifasciata* e *A. mellifera* expostas ao Imidacloprido por via oral, Aguiar *et al.* (2023) observaram uma redução significativa no comportamento de resposta de extensão da probóscide a um estímulo com solução de sacarose, bem como prejuízos na capacidade de aprendizagem e memórias de ambas as espécies. No entanto, segundo os mesmos autores, o efeito tóxico observado no estudo foi mais evidente em *M. quadrifasciata* do que em *A. mellifera*, demonstrando maior sensibilidade do i.a. em abelhas sociais sem ferrão do que em abelhas africanizadas.

Em outro bioensaio, operárias de *M. quadrifasciata* expostas aos inseticidas Espinetoram, Abamectina e Tiametoxam apresentaram alta letalidade nas rotas de exposição oral e tópica, além de alterações na atividade locomotora em doses subletais (Piovesan *et al.*, 2020). Os efeitos dos agrotóxicos em *M. quadrifasciata* também foram observados em campo, onde operárias expostas a aplicação de diferentes agrotóxicos apresentaram alterações morfológicas relevantes (Prado-Silva *et al.*, 2018).

Estes resultados confirmam a alta susceptibilidade desta espécie a diversos estressores de diferentes grupos químicos. Deste modo, é preciso ampliar os estudos de toxicologia, tendo em vista a ampla variedade de produtos utilizados nos cultivos agrícolas e seus efeitos letais e subletais, que não são facilmente observados no campo, mas podem afetar significativamente a sobrevivência e desenvolvimento das colônias.

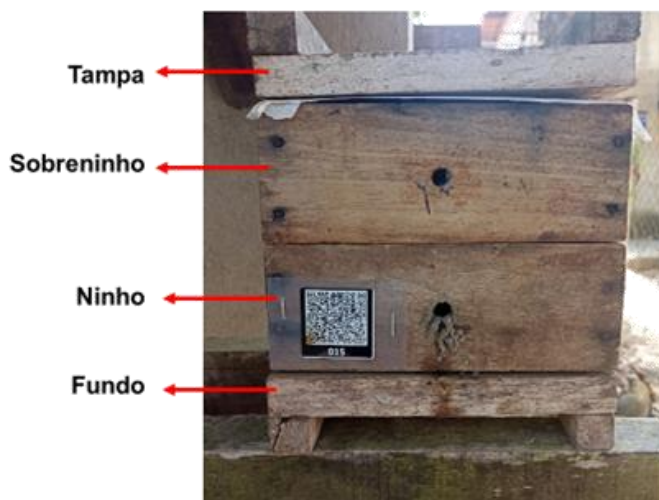
3. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nas instalações do Grupo de Pesquisa Insecta do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), na cidade de Cruz das Almas, Bahia.

3.1 Manejo das colônias

As abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* foram provenientes de colônias instaladas em caixas de madeira padrão INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), com medidas internas de 12 x 12 cm, compostas por fundo, ninho, sobre ninho e tampa (Figura 4). As abelhas foram manejadas com alimentação suplementar energética (xarope de água e açúcar) duas vezes por semana para manutenção das colônias.

Figura 4. Caixa de criação para coleta das abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* para bioensaio e divisórias da caixa modelo INPA.



Autor: Acervo Insecta, 2024.

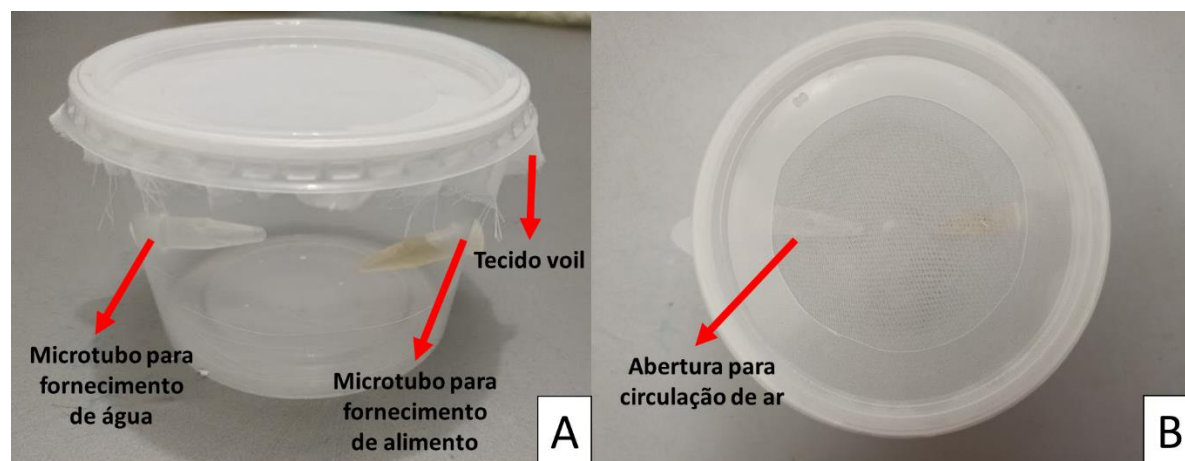
3.2 Coleta de abelhas

Para realização deste bioensaio foi solicitada licença para coleta de material biológico junto ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), aprovada sob o número 85006-1. As abelhas foram coletadas em tubos de centrifugação tipo Falcon de 50 mL posicionado na entrada da colônia para captura das abelhas campeiras. Posteriormente elas foram levadas ao Laboratório de Criação e Comportamento, onde foram anestesiadas por resfriamento a -14° C por 180 segundos (Botina *et al.*, 2020). Grupos de 10 abelhas foram colocados em

gaiolas de criação para cada tratamento e repetição, de acordo com a metodologia empregada para cada via de exposição.

As gaiolas foram confeccionadas com potes plásticos de 500 mL, com uma abertura na tampa forrada com tecido Voil para permitir a circulação do ar no interior da gaiola e duas aberturas laterais de aproximadamente 10 mm para encaixe de dois microtubos de 1,5 mL, que foram utilizados para fornecimento de água e alimento para as abelhas (Figura 5). O interior das gaiolas foi lixado com lixa para metal, grão 100, para melhorar a aderência e facilitar o acesso das abelhas aos alimentadores (Botina *et al.*, 2020).

Figura 5. Gaiola de criação das abelhas para testes toxicológicos. A - vista lateral; B - vista superior.



Autor: Acervo Insecta, 2024.

3.3 Ingredientes ativos

Os ingredientes ativos selecionados para este estudo foram o acaricida Fenpiroximato (CAS N° 134098-61-6), o fungicida Triflumizol (CAS N° 68694-11-1) e o inseticida Lambda-Cialotrina (CAS N° 91465-08-6). Os i.a. utilizados foram em grau técnico, com pureza igual ou superior a 95%, adquiridos na Sigma-Aldrich Brasil Ltda. A seleção desses i.a. foi baseada em revisão de literatura, em que foi constatado que não havia publicações de estudos de toxicologia com os referidos i. a. para *Melipona quadrifasciata anthidioides*.

3.4 Delineamento experimental

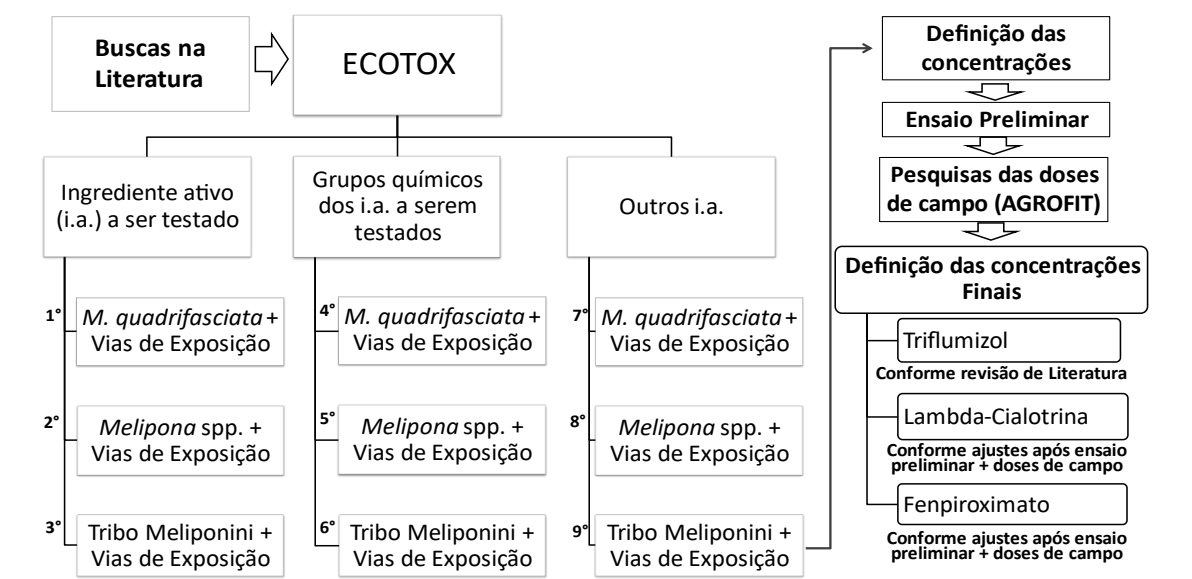
O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), onde cada via de exposição e ingrediente ativo foram analisadas

separadamente para avaliação de toxicidade. Em cada tratamento foram aplicadas três repetições (gaiolas com 10 abelhas), totalizando 30 abelhas por tratamento.

3.5 Doses e concentrações testadas

As concentrações testadas nos bioensaios com os ingredientes ativos Triflumizol, Fenpiroximato e Lambda-Cialotrina foram definidas com base em estudos toxicológicos de DL₅₀ (Dose Letal Mediana) e ou CL₅₀ (Concentração Letal Mediana) nas vias de exposição por ingestão de alimento contaminado, aplicação tópica e superfície de contato contaminada. Para a definição das concentrações foram realizadas buscas no banco de dados *ECOTOXicology Knowledgebase* (<https://cfpub.epa.gov/ecotox>) e outras fontes, seguindo os seguintes critérios e ordem de seleção: 1º) i.a. testado + *M. quadrifasciata* + vias de exposição; 2º) i.a. testado + *Melipona* spp. + vias de exposição; 3º) i.a. testado + Tribo Meliponini + vias de exposição; 4º) grupo químico do i.a. testado + *M. quadrifasciata* + vias de exposição; 5º) grupo químico do i.a. testado + *Melipona* spp. + vias de exposição; 6º) grupo químico do i.a. testado + Tribo Meliponini + vias de exposição; 7º) outros grupos químicos + *M. quadrifasciata* + vias de exposição; 8º) outros grupos químicos + *Melipona* spp. + vias de exposição; e 9º) outros grupos químicos + Tribo Meliponini + vias de exposição. Após esta etapa, foram realizados ensaios preliminares cujos resultados foram analisados para avaliar a necessidade de um novo ensaio com concentrações ajustadas. Assim, as concentrações finais foram estabelecidas conforme análise do ensaio preliminar e ou valores de maior e menor concentração dos i.a. presentes nas doses de campo, recomendadas por fabricantes de produtos comerciais, conforme ilustrado na Figura 6. As concentrações obtidas a partir do procedimento descrito e utilizadas neste estudo estão apresentadas na Tabela 2.

Figura 6. Fluxograma do procedimento de definição das concentrações a serem testadas.



Autor: Acervo Insecta, 2024.

Tabela 2. Concentrações de ingrediente ativo testadas em *Melipona quadrifasciata anthidioides* em diferentes vias de exposição.

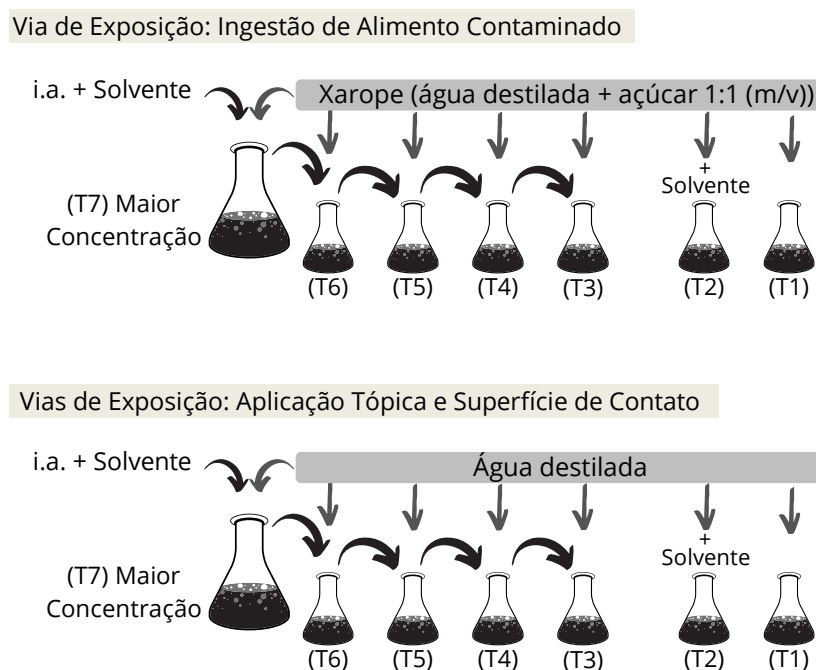
Via de exposição: Ingestão de Alimento Contaminado (µg/mL)							
Ingredientes ativos:	T1*	T2*	T3	T4	T5	T6	T7
λ-Cialotrina	Água	Etanol	1,44 ²	2,88 ²	5,76 ²	10 ³	83,3 ³
Fenpiroximato	Água	ACS	12,5 ³	25 ³	37,5 ³	50 ³	-
Triflumizol	Água	Etanol	0,2 ¹	0,4 ¹	0,8 ¹	1,6 ¹	3,2 ¹
Via de exposição: Superfície de Contato Contaminada (µg/mL)							
Ingredientes ativos:	T1*	T2*	T3	T4	T5	T6	T7
λ-Cialotrina	Água	Etanol	41,65 ³	83,3 ³	124,95 ³	166,6 ³	-
Fenpiroximato	Água	ACS	18,87 ³	37,75 ³	50 ³	73,5 ²	100 ³
Triflumizol	Água	Etanol	16 ¹	32 ¹	64 ¹	124 ¹	248 ¹
Via de exposição: Aplicação Tópica (µg/µL)							
Ingredientes ativos:	T1*	T2*	T3	T4	T5	T6	T7
λ-Cialotrina	Água	Etanol	0,01 ³	0,083 ³	0,345 ²	0,69 ²	1,38 ²
Fenpiroximato	Água	ACS	0,025 ³	0,037 ³	0,05 ³	0,1 ³	-
Triflumizol	Água	Etanol	50 ¹	100 ¹	200 ¹	400 ¹	600 ¹

* T1 é o controle em que as abelhas foram expostas a água e T2 expostas à substância utilizada para dissolver o i.a., podendo ser etanol ou acetona (ACS), a depender da recomendação expressa na bula. λ = Lambda.
¹Valores definidos com base em revisão de literatura; ²Valores ajustados com base em experimento preliminar; ³Valores definidos com base nas recomendações de aplicação em campo.

3.5.1 Diluição dos ingredientes ativos

As diluições e preparo das soluções foram realizadas da seguinte forma: na via de exposição por ingestão de alimento contaminado, o ingrediente ativo foi inicialmente diluído em solvente (etanol/acetona) e em seguida foi acrescentado o xarope de água destilada e açúcar, preparado na proporção 1:1 (m/v), até atingir o volume final de solução na maior concentração a ser testada. A partir da solução de maior concentração, foram realizadas sucessivas diluições para preparo das demais concentrações, conforme ilustrado na Figura 7. Nas vias de exposição tópica e superfície de contato, o i.a. foi diluído inicialmente em solvente (etanol/acetona) e posteriormente adicionado água destilada até atingir o volume final da solução de maior concentração a ser testada. As soluções das demais concentrações foram preparadas a partir de sucessivas diluições da solução de maior concentração (Figura 7).

Figura 7. Sequência de diluição e preparo das soluções de i.a e tratamentos controles para testes de toxicidade em três vias de exposição.



Autor: Acervo Insecta, 2024.

Em todas as vias de exposição foram aplicados dois tratamentos controle (controle água e controle solvente). Na via de exposição por ingestão de alimento contaminado, as abelhas do controle água foram alimentadas apenas com xarope de água destilada e açúcar 1:1 (m/v); já as abelhas do controle solvente foram

alimentadas com o mesmo xarope acrescido do solvente (etanol/acetona), mantendo a proporção de solvente presente na maior concentração do ingrediente ativo testado. Nas demais vias de exposição (tópica e superfície de contato), a aplicação do tratamento controle água se deu apenas com água destilada e no controle solvente foi aplicado uma solução de água destilada e solvente (etanol/acetona), na mesma proporção de solvente presente na maior concentração do ingrediente ativo, conforme ilustrado na Figura 7. Em todas as vias, a quantidade de solvente presente nas soluções de todas as concentrações e do controle solvente não excederam 1% do volume final da solução, conforme orientações expressas no protocolo de testes toxicológicos em abelhas *Apis mellifera* (OECD N° 213, 1998a).

3.6 Vias de exposição

As abelhas foram expostas aos i.a. em três vias diferentes: aplicação tópica, ingestão de alimento contaminado e contato a superfície contaminada. Os procedimentos dos testes toxicológicos foram realizados conforme metodologia preconizada pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 1998a, 1998b) para *A. mellifera*, com adaptações no que diz respeito a anestesia das abelhas (realizada por resfriamento), tempo de exposição (estendido até 96 horas) e criação das abelhas em laboratório (temperatura de $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$). A exposição por superfície de contato foi realizada conforme metodologia utilizada em bioensaios semelhantes (Del-Sarto *et al.*, 2014; Leite *et al.*, 2022).

As abelhas utilizadas no experimento foram coletadas nas colônias e encaminhadas para o Laboratório de Criação e Comportamento dos Insetos do Grupo de Pesquisa Insecta, conforme descrito no item 2.2. Grupos de 10 abelhas foram acondicionadas nas gaiolas experimentais em três repetições para cada tratamento e foram mantidas em câmaras de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) com ausência de luz e reguladas a temperatura de $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, umidade relativa aproximada de $70\% \pm 10\%$ durante todo o período experimental.

As abelhas foram avaliadas 1, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após aplicação dos tratamentos, sendo registrada a quantidade de abelhas vivas e mortas e que apresentavam variações comportamentais. As variações comportamentais observadas estão descritas na Tabela 3. Nas avaliações, foram consideradas como abelhas mortas aquelas que não responderam ao estímulo com pincel de pelo fino e em seguida foram removidas das gaiolas (Del-Sarto *et al.*, 2014; Tomé *et al.*, 2017).

Tabela 3. Descrição das variações comportamentais observadas durante as avaliações da toxicidade do ingrediente ativo nas abelhas.

Comportamento	Descrição	Referência
Paralisia	As abelhas não podem andar e mostram apenas movimentos muito débeis das pernas e antenas, apenas fraca resposta à estimulação, por contato; as abelhas podem se recuperar, mas geralmente morrem.	Leite <i>et al.</i> , 2018; Lourenço <i>et al.</i> , 2012; OECD N° 245, 2017.
Dificuldade de Locomoção	Abelhas ainda em pé e a tentar andar, mas mostrando sinais de redução da coordenação e tremores.	OECD N° 245, 2017.
Agitação	Abelhas voando ou se locomovendo rapidamente no interior da gaiola respondendo ao estímulo da luz.	OECD N° 245, 2017.
Desorientação	Abelhas que não apresentam dificuldade de locomoção, mas não seguem as abelhas que tendem a ir na direção da luz, ficam andando em círculo ou de um lado para outro da gaiola.	Leite <i>et al.</i> , 2018.
Prostração	As abelhas mostram apenas reações baixas ou retardadas à estimulação, por contato; as abelhas estão paradas sem movimento na gaiola.	OECD N° 245, 2017.
Agitação das Asas	Abelhas paradas ou se movimentando na gaiola com abdômen erguido e batendo as asas freneticamente.	Lourenço <i>et al.</i> , 2012.
Autolimpeza	As abelhas apresentam excessivamente o comportamento de autolimpeza corporal utilizando suas pernas.	Leite <i>et al.</i> , 2018; OECD N° 245, 2017.
Cortando Papel	As abelhas permanecem no fundo da gaiola cortando o papel filtro utilizado na via de superfície de contato contaminada.	Observação do autor

3.6.1 Ingestão de Alimento Contaminado

Antes do fornecimento do alimento contaminado com os ingredientes ativos, as abelhas ficaram nas gaiolas em BOD sem suprimento de água e alimento por duas horas. Após esse período foi fornecido em um micro tubo de 1,5 mL, a água e o alimento (xarope de água destilada + açúcar, na proporção 1:1) acrescido dos ingredientes ativos nas concentrações estabelecidas para cada tratamento (Tabela 1) e oferecido às abelhas *Ad libitum* durante todo o período experimental. No grupo controle com água foi utilizado o mesmo xarope de água destilada com açúcar, porém sem adição de nenhum outro produto. Já no grupo controle com solvente, o solvente utilizado na diluição do ingrediente ativo foi adicionado ao xarope, mantendo a proporção de solvente presente na maior concentração de ingrediente ativo testada, conforme descrito no item 3.5.1. A cada horário de avaliação, o micro tubo de alimento contaminado foi pesado para mensurar a quantidade de alimento consumida pelas abelhas durante o experimento, sendo repostado o alimento sempre que necessário.

3.6.2 Aplicação Tópica

Nesta via de exposição, as abelhas previamente anestesiadas por resfriamento receberam na região do tórax uma quantidade de 1 µL de solução de i.a. nas concentrações estabelecidas para cada tratamento (Tabela 1). No grupo controle com água, as abelhas foram tratadas com 1 µL de água destilada. No grupo de controle com solvente, foi utilizado 1 µL de solução de água destilada e o solvente utilizado na diluição do i.a, na mesma proporção de solvente presente na maior concentração testada, conforme descrito no item 3.5.1. A aplicação foi realizada com auxílio de uma micropipeta de monocal de volume variável (0,5-10 µL) da marca Ecopipette®. Após a aplicação de cada tratamento, as abelhas foram acondicionadas nas gaiolas e mantidas em temperatura ambiente por cerca de 10 minutos para a dissipação da solução aplicada na abelha. Após esse tempo, as gaiolas foram levadas à BOD onde as abelhas tiveram acesso a água e alimento *Ad libitum*, durante todo o experimento.

3.6.3 Superfície de Contato Contaminada

Na via de exposição superfície de contato contaminada foi utilizada a Torre de Pulverização Limatec® para aplicação da solução de i.a. na gaiola. Cada gaiola

estava com o fundo coberto com papel filtro para a absorção da solução de i.a. aplicado. Foi pulverizado uma quantidade de 1 mL de solução de i.a. em cada gaiola, que em seguida ficaram em temperatura ambiente por 30 minutos para secagem da solução aplicada. Dois tratamentos controles foram aplicados: no controle água foi pulverizado 1 mL de água destilada no interior da gaiola e no controle solvente 1 mL de solução de água destilada e o solvente utilizado na diluição do i.a., conforme descrito no item 3.5.1. Após a secagem, cada gaiola recebeu 10 abelhas, que em seguida foram levadas para BOD onde foram mantidas durante todo o período experimental, supridas de alimento e água *Ad libitum*.

3.7 Análise e interpretação dos dados

Para avaliação da sobrevivência das abelhas foi aplicada a análise de sobrevivência de Kaplan-Meier, seguida da aplicação do teste de log-rank para comparação das curvas de sobrevivência. As DL_{50} foram estimadas por meio da análise de dose-resposta. O consumo de alimento na via de exposição por ingestão de alimento contaminado foi avaliado para comparar a média de consumo de alimento entre os tratamentos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software* estatístico R versão 4.2.3 (R Core Team, 2023). O nível de significância $\alpha=0,05$ foi o adotado para todas as análises realizadas.

3.7.1 Avaliação de sobrevivência

Os resultados de sobrevivência foram submetidos à análise de sobrevivência de Kaplan-Meier utilizando o pacote “Survival” (Therneau; Grambsch, 2000), e curvas de sobrevivência foram geradas utilizando a função “survfit”, para determinar a proporção de abelhas sobreviventes em relação ao intervalo de tempo após a aplicação do i.a. Posteriormente, foi aplicado o teste de log-rank por meio da função “survdiff”, para testar a hipótese nula de que as curvas de sobrevivência eram idênticas, quando rejeitada a hipótese nula, foi realizada a comparação entre os pares de tratamentos pelo teste de log-rank, utilizando a função “pairwise_survdiff” do pacote “survminer” (Kassambara; Kosinski; Biecek, 2021), com correção dos valores de p pelo método de Benjamini-hochberg (Benjamini; Hochberg, 1995). Os mesmos dados foram submetidos a análise de dose-resposta utilizando a função “drm” do pacote “drc” (Ritz *et al.*, 2015) e foram geradas curvas de dose-resposta pelo modelo de regressão log-logística para dados binomiais. A partir da regressão

gerada, foram estimados valores de Dose Letal Mediana (DL_{50}), utilizando a função “ED” do pacote “drc” (Ritz *et al.*, 2015).

3.7.3 Consumo de Alimento

Na via de exposição por ingestão de alimento contaminado foi calculada a média do consumo total de alimento por abelha em 96 horas. Para isso, o microtubo de alimento de cada gaiola foi pesado em cada horário de avaliação e em seguida foi subtraído o peso atual pelo peso da avaliação anterior, de forma a obter-se a quantidade de alimento consumida (g). Esse valor foi então dividido pelo número de abelhas vivas no horário anterior ao da pesagem do microtubo, representando o início do intervalo de tempo mensurado (OECD N° 245, 2017). Em seguida, as médias de consumo de alimento por abelha em cada horário (g/org) foram somadas para se obter o consumo total de alimento por abelha de cada gaiola em 96 horas. O peso de 1 mL do xarope foi mensurado 10 vezes, obtendo-se uma média de 1,19 g e desvio padrão de 0,01 g. Esse peso foi utilizado para calcular o volume total de alimento (mL/org) e a quantidade total de i.a. consumida por abelha ($\mu\text{g}/\text{org}$) em cada repetição de cada tratamento. A média de consumo total de i.a. por abelha de cada tratamento ($\mu\text{g}/\text{org}$) foi utilizada para calcular a DL_{50} do i.a. por ingestão de alimento contaminado. A média de consumo total de alimento por abelha em 96 horas (g/org) foi utilizada para comparar a quantidade de alimento consumida em cada tratamento.

Para avaliar o consumo médio de alimento entre os tratamentos, os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos resíduos e ao teste de Bartlett para avaliar a homogeneidade das variâncias. Quando atendido os pressupostos, foi realizada a análise de variância utilizando o pacote “ExpDes.pt” (Ferreira; Cavalcanti; Nogueira, 2021), para testar a hipótese nula de que quantidade de alimento consumida por abelha foi igual em todos os tratamentos, se rejeitada a hipótese nula ($p < 0,05$), o teste post-hoc de Skott-Knott foi aplicado para agrupar as médias dos tratamentos em grupos iguais. Quando os pressupostos para realização da análise de variância não foram atendidos, foi realizada a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando o pacote “rstatix” (Kassambara, 2023). Quando rejeitada a hipótese nula ($p < 0,05$), o teste post-hoc de Dunn com correção dos valores de p pelo método de Benjamini-Hochberg foi aplicado para comparar os pares de medianas dos tratamentos.

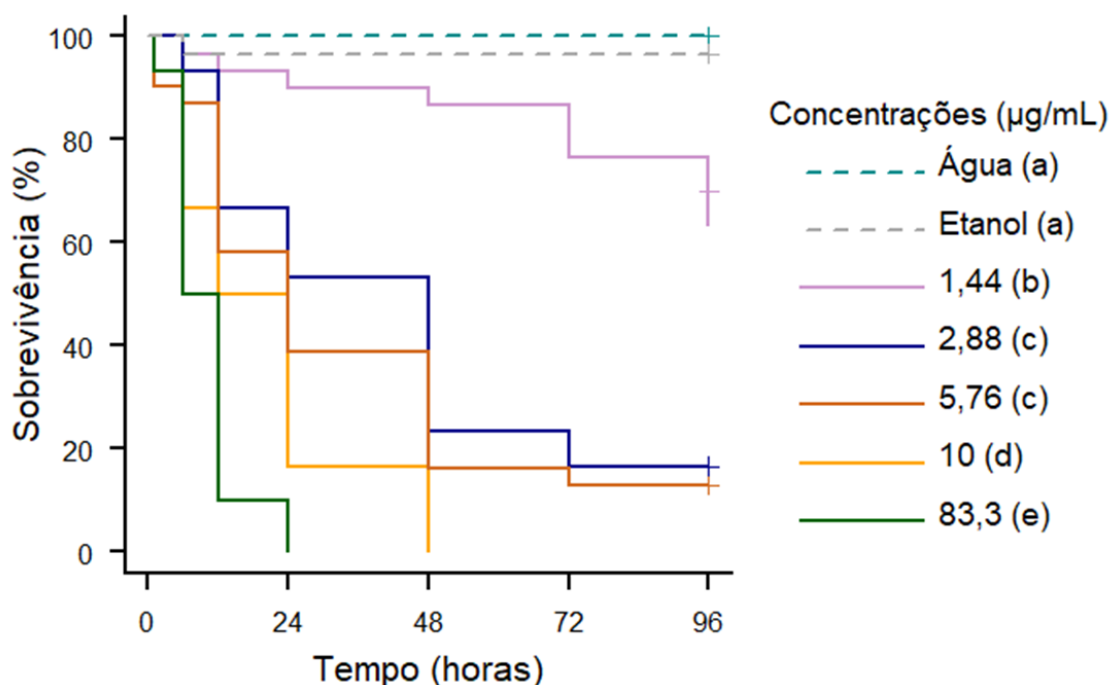
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Lambda-Cialotrina

O ingrediente ativo Lambda-Cialotrina, testado em três vias de exposição, apresentou efeitos tóxicos para *M. q. anthidioides*, desde mortalidade até efeitos subletais, como alterações comportamentais em todas as vias de exposição testadas.

Na via de exposição por Ingestão de Alimento Contaminado, as curvas de sobrevivência das abelhas nas diferentes concentrações foram consideradas significativas, de acordo com o teste de log-rank ($\chi^2 = 195$; gl= 6; $p < 0,01$). Observou-se que as abelhas expostas às concentrações mais altas apresentaram menor proporção de sobrevivência, diferindo estatisticamente dos tratamentos controle e das concentrações mais baixas (Figura 8).

Figura 8. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* expostas ao Lambda-Cialotrina por ingestão de alimento contaminado. Concentrações seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de log-rank com correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg ao nível de 5% de significância.



As concentrações de 10 µg/mL e 83,3 µg/mL, respectivamente menor e maior quantidade de i.a. presente nas recomendações de aplicação em campo,

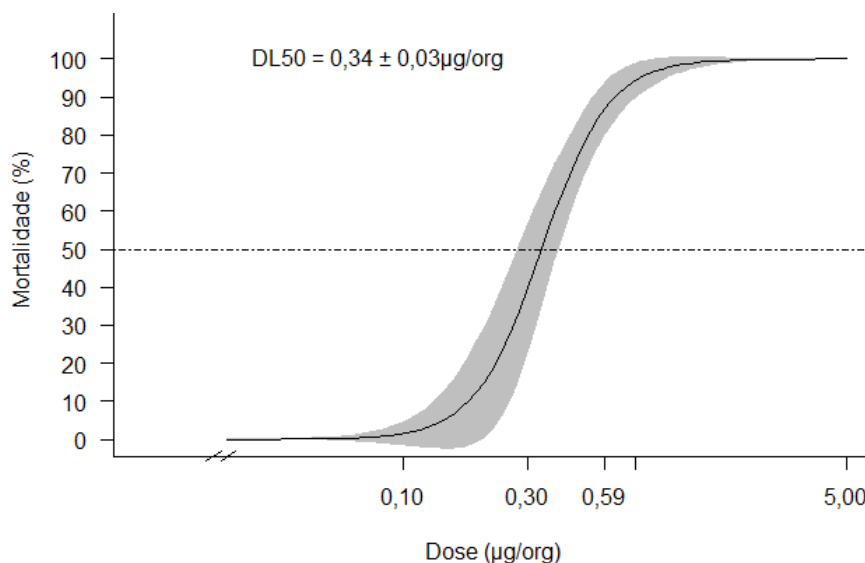
ocasionaram em 100% de mortalidade das abelhas em até 48 horas de exposição (Tabela 4). Este resultado indica alta toxicidade deste ingrediente ativo para as abelhas, tendo em vista que estas concentrações são equivalentes às recomendações para aplicação em campo de produtos formulados com este i.a. Os tratamentos controles água e etanol não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de log-rank ($p=0,3350$) e correção dos valores de p pelo método de Benjamini-Hochberg, indicando que o solvente utilizado na diluição do i.a. não influenciou na mortalidade das abelhas.

Tabela 4. Percentual de abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* sobreviventes em 96 horas após exposição ao Lambda-Cialotrina por ingestão de alimento contaminado, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamento	Proporção de sobrevivência (%)	Erro Padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	100	-	-
T2 (Etanol)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T3 (1,44 $\mu\text{g/mL}$)	63,3	8,80	[48,2; 83,2]
T4 (2,88 $\mu\text{g/mL}$)	16,7	6,80	[7,49; 37,1]
T5 (5,76 $\mu\text{g/mL}$)	12,9	6,02	[5,7; 32,2]
T6 (10 $\mu\text{g/mL}$)	0	-	-
T7 (83,3 $\mu\text{g/mL}$)	0	-	-

A partir da análise de dose-resposta pode-se observar uma relação crescente entre a quantidade de i.a. consumida e o percentual de mortalidade das abelhas. Desta forma, a relação dose-resposta observada na Figura 9, demonstra que à medida que as abelhas consomem uma quantidade maior de ingrediente ativo a probabilidade de sobrevivência delas diminui. Assim, a partir dos dados obtidos foi calculada uma DL_{50} do Lambda-Cialotrina em $0,34 \pm 0,03 \mu\text{g/org}$ por ingestão de alimento contaminado em 96 horas (Figura 9).

Figura 9. Curva de dose-resposta, DL₅₀ e erro padrão do Lambda-Cialotrina para *Melipona quadrifasciata anthidioides* por ingestão de alimento contaminado em 96 horas.



Com relação ao consumo de alimento das abelhas ao longo das 96 horas, pode-se observar uma redução significativa na média de consumo total de alimento por abelha a medida que a concentração de ingrediente ativo aumenta ($F_{(6,14)} = 30,08$; $p < 0,01$). Este fato pode estar relacionado a mortalidade das abelhas expostas às maiores concentrações de i.a. nas primeiras horas do experimento, sendo assim, os tratamentos com concentrações menores as abelhas consumiram alimento por mais tempo (Figura 10).

No entanto, os tratamentos controles, cuja sobrevivência foi estatisticamente igual, o consumo total de alimento por abelha foi estatisticamente diferente, o que sugere que a presença do etanol no alimento fornecido para as abelhas pode ter causado repelência delas ao alimento. Nas concentrações de 2,88 µg/mL e 5,76 µg/mL, em que as curvas de sobrevivência foram iguais, o consumo total de alimento foi menor na concentração mais alta, indicando que pode ter havido uma repelência maior ao alimento contaminado nas concentrações mais altas.

Na via de exposição tópica, as curvas de sobrevivência das diferentes concentrações a qual as abelhas foram expostas diferiram estatisticamente entre si de acordo com o teste de log-rank ($\chi^2 = 188$; gl= 6; $p < 0,01$). Observou-se que as abelhas expostas às concentrações mais altas apresentaram uma redução significativa na sobrevivência, diferindo estatisticamente dos tratamentos controle e das concentrações mais baixas (Figura 11).

Figura 10. Gráfico de Boxplot para o consumo total de alimento por abelha campeira de *Melipona quadrifasciata anthidioides* de cada tratamento. O “x” no interior do gráfico indica a média de consumo total por abelha de cada tratamento. Caixas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de significância.

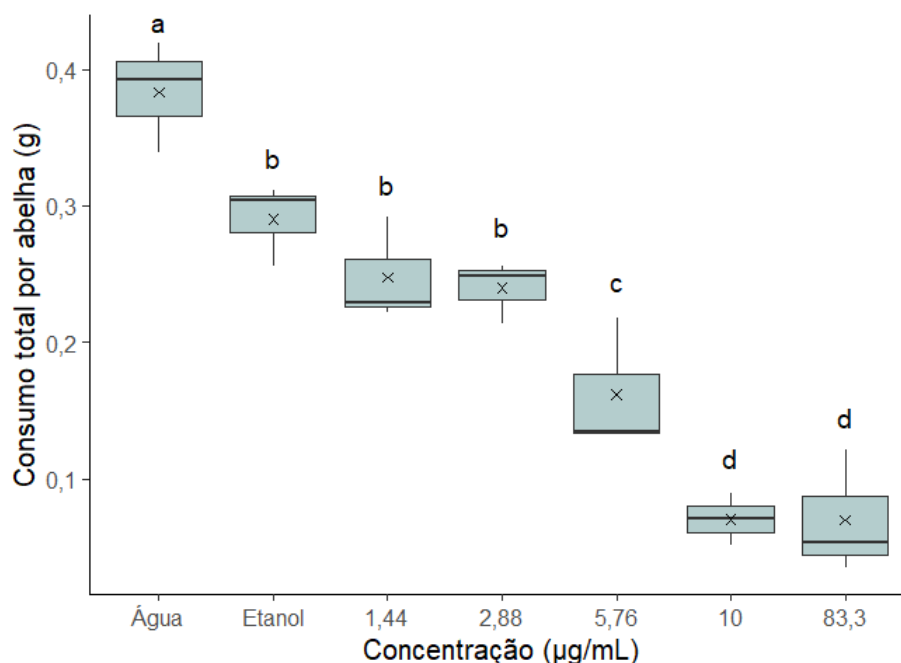
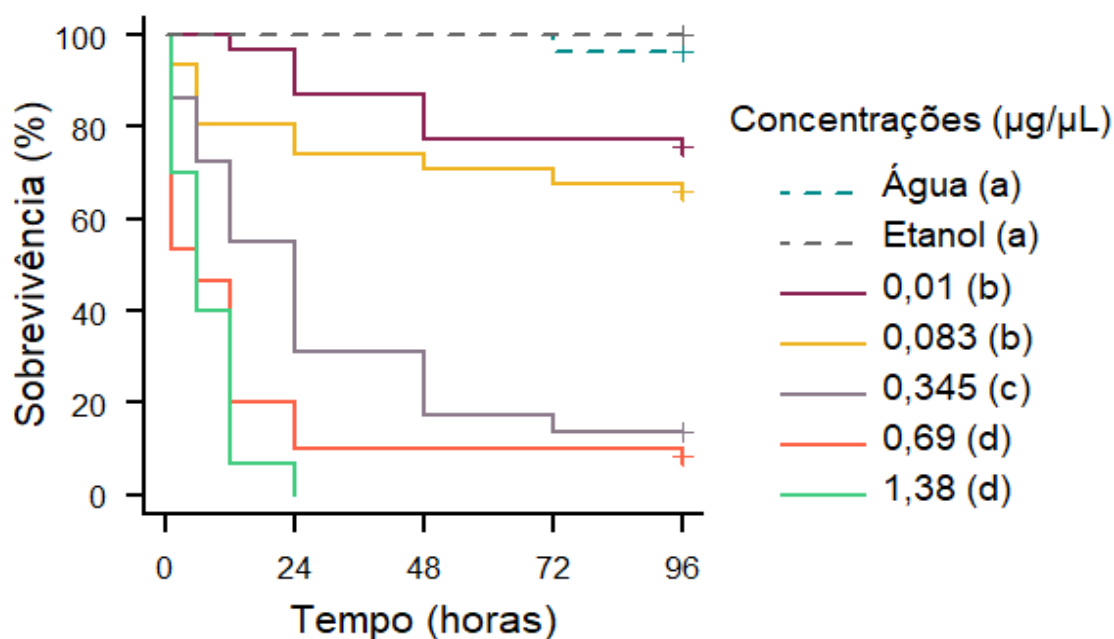


Figura 11. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* expostas ao Lambda-Cialotrina por aplicação tópica. Concentrações seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de log-rank com correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg ao nível de 5% de significância.



As concentrações de 0,01 µg/µL e 0,083 µg/µL, respectivamente equivalentes a quantidade de i.a. presente na menor e maior dose recomendadas para aplicação em campo, ocasionaram uma redução significativa no percentual de sobrevivência (Tabela 5), evidenciando a toxicidade deste i.a. para as abelhas. Os tratamentos controles água e etanol não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de log-rank ($p=0,32334$) com correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg, indicando que o solvente utilizado na diluição do i.a. não influenciou na mortalidade das abelhas.

Tabela 5. Percentual de abelhas campeiras sobreviventes de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em 96 horas após exposição ao Lambda-Cialotrina por aplicação tópica, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamento	Proporção de sobrevivência (%)	Erro Padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	96,55	3,39	[90,13; 100]
T2 (Etanol)	100	-	-
T2 (0,01 µg/µL)	74,2	7,86	[60,3; 91,3]
T3 (0,083 µg/µL)	64,5	8,59	[49,7; 83,8]
T4 (0,345 µg/µL)	13,8	6,40	[5,55; 34,3]
T5 (0,69 µg/µL)	6,67	4,55	[1,75; 25,4]
T6 (1,38 µg/µL)	0	-	-

A partir da análise de dose-resposta, pode-se observar uma relação crescente do percentual de mortalidade das abelhas à medida que se aumentou a dose aplicada na abelha. Desta forma, a relação dose-resposta observada na Figura 12, demonstra que a medida em que se aumentou a dose aplicada topicamente na abelha, a probabilidade de sobrevivência delas diminuiu. A partir dos dados obtidos foi calculada uma DL_{50} do Lambda-Cialotrina em $0,063 \pm 0,016$ µg/org por exposição tópica em 96 horas (Figura 12).

Na via de exposição por superfície de contato contaminada, as curvas de sobrevivência das diferentes concentrações às quais as abelhas foram expostas não diferiram estatisticamente entre si, de acordo com o teste de log-rank ($\chi^2 = 9,7$; gl= 5; $p=0,09$). As abelhas expostas às concentrações mais altas apresentaram uma redução na proporção de sobrevivência. No entanto essa redução não diferiu

estatisticamente dos tratamentos controle e das concentrações mais baixas (Figura 13).

Figura 12. Curva de dose-resposta e DL₅₀ e erro padrão do Lambda-Cialotrina para *Melipona quadrifasciata anthidioides* por via de exposição tópica em 96 horas.

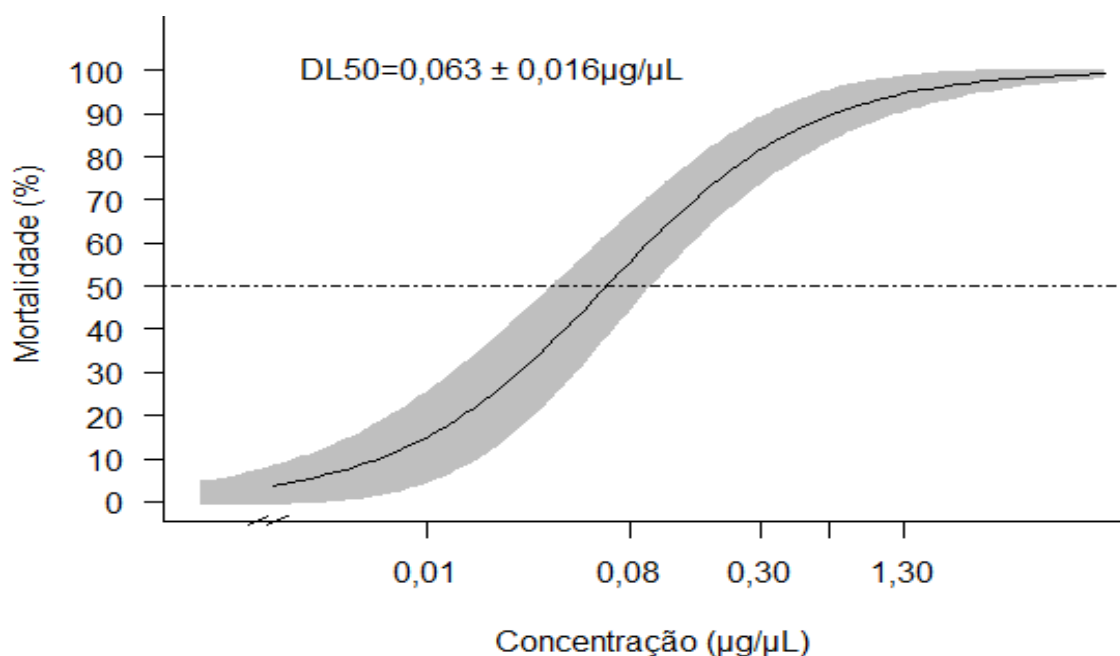
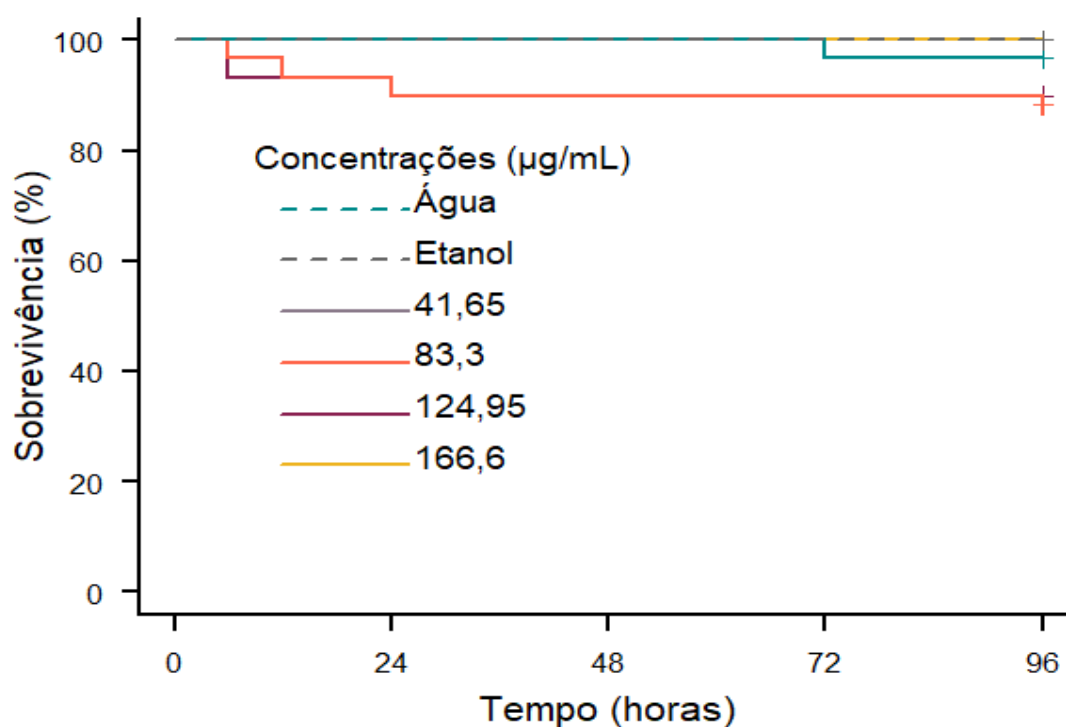


Figura 13. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* expostas ao Lambda-Cialotrina por contato com superfície contaminada.



Nesta via de exposição, mesmo as maiores concentrações testadas não ocasionaram redução significativa no percentual de sobrevivência das abelhas (Tabela 6). No entanto, apesar das concentrações testadas não terem causado mortalidade estatisticamente significativa em relação aos tratamentos controles, as abelhas expostas a superfície de contato contaminada com o i.a. apresentaram alterações comportamentais evidentes nas primeiras horas de exposição.

Tabela 6. Percentual de abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* sobreviventes em 96 horas após exposição ao Lambda-Cialotrina por superfície de contato contaminada, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamento	Proporção de sobrevivência (%)	Erro Padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T2 (Etanol)	100	-	-
T3 (41,65 $\mu\text{g/mL}$)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T4 (83,3 $\mu\text{g/mL}$)	86,7	6,21	[75,3; 99,7]
T5 (124,95 $\mu\text{g/mL}$)	90,0	5,48	[79,9; 100]
T6 (166,6 $\mu\text{g/mL}$)	100	-	-

Alterações comportamentais como paralisia, dificuldade de locomoção, desorientação, comportamento excessivo de autolimpeza e agitação constante das asas foram mais evidentes nas primeiras 12 horas nos tratamentos com i.a. do que nos tratamentos controles. Após 24 horas de exposição as variações comportamentais observadas foram semelhantes em todos os tratamentos e não mais se observou paralisia e dificuldade de locomoção.

O Lambda-Cialotrina é um ingrediente ativo amplamente utilizado no Brasil, pode ser encontrado, tanto em inseticidas para uso agrícola como em formulações para uso doméstico. O composto está presente em 40 formulações comerciais de agrotóxicos (Brasil, 2023). De acordo com dados do IBAMA, foram comercializadas mais de quatro mil toneladas de produtos formulados com o Lambda-Cialotrina em 2022, o que o coloca como o 27º i.a. mais comercializado em 2022 (IBAMA, 2023).

Este inseticida atua no sistema nervoso dos insetos, influenciando na ativação dos canais de sódio, que desempenham um papel crucial na condução do

estímulo nervoso (Davies *et al.*, 2008). A sua ação modifica o ciclo de abertura dos canais de sódio, resultando em uma estimulação nervosa contínua. Esse efeito provoca sintomas como tremores, perda de coordenação motora, paralisia e, eventualmente, leva à morte dos insetos (Soderlund, 2020).

Neste estudo, as abelhas submetidas à diferentes vias de exposição e concentrações de Lambda-Cialotrina apresentaram alterações comportamentais notáveis, evidenciando uma resposta sensível e imediata a esse i.a. Nas três vias de exposição testadas foi possível notar já na primeira hora após a exposição, alterações comportamentais evidentes, a exemplo de: dificuldade de locomoção, prostração e paralisia, que posteriormente evoluíram para morte dos indivíduos, especialmente nas vias de exposição tópica e ingestão de alimento contaminado.

Esta resposta aguda demonstra a alta toxicidade da Lambda-Cialotrina principalmente nas concentrações mais elevadas, que conforme já mencionado, sua atuação no sistema nervoso do inseto provoca alterações na coordenação motora, paralisia e morte. Esse efeito está relacionado ao "*Knock-Down*", um efeito já conhecido causado aos insetos contaminados com piretróides, que se refere à rápida incapacitação ou imobilização do inseto após a exposição ao i.a. (Santos; Areas; Reyes, 2007).

Entretanto, na via de exposição por superfície de contato contaminada, as alterações comportamentais das abelhas, observadas nas primeiras 24 horas, não evoluíram para mortalidade. Este fato pode estar relacionado a uma possível degradação do i.a. ao longo do tempo, em função das condições de temperatura e umidade. Além disso, é provável que enzimas do sistema antioxidante dos insetos tenham atuado em processos de desintoxicação celular das abelhas, conforme observado em estudos que avaliaram a toxicidade do Lambda-Cialotrina em outros insetos (Hafeez *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023).

Apesar de não ter causado efeito letal significativo na via de exposição por superfície de contato, as alterações comportamentais observadas durante as primeiras 24 horas representam um risco à sobrevivência das abelhas, no caso de uma possível exposição a nível de campo. As abelhas contaminadas ficariam imóveis por muito tempo, o que as tornariam susceptíveis à predadores e outras condições de risco, como insolação e desidratação.

Neste estudo, além das alterações no comportamento das abelhas, foi observada uma redução significativa no consumo de alimento por aquelas expostas

ao ingrediente ativo (i.a.) por ingestão. Esses resultados sugerem uma interação entre a Lambda-Cialotrina e o comportamento alimentar das abelhas, indicando uma resposta modificada a esse piretróide.

A constatação acima pode ser explicada pela propriedade repelente dos piretróides, conforme relatado por Thompson e Wilkins (2003), que observaram uma redução na quantidade de alimento consumida por abelhas expostas ao Lambda-Cialotrina e outros piretróides. Apesar dessa evidência, ainda há necessidade de estudos com doses subletais para confirmação desta hipótese, tendo em vista que a mortalidade e a paralisia observada nas abelhas podem ter influenciado em um menor consumo total de alimento em 96 horas.

No contexto da presente pesquisa foi observado efeito tóxico letal significativo do Lambda-Cialotrina por ingestão de alimento contaminado e aplicação tópica, resultando em uma DL_{50} de $0,34 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{org}$ e $0,063 \pm 0,016 \mu\text{g}/\text{org}$, respectivamente. Observa-se que o i.a. foi mais tóxico às abelhas quando expostas via contato tópico, este fato pode ser explicado devido ao modo de ação deste i.a. nos insetos. Ao penetrar a cutícula do organismo, o i.a. atravessa rapidamente membranas biológicas e tecidos, devido à sua natureza lipofílica, interrompe a condução nervosa em minutos, acarretando a interrupção da alimentação, perda do controle muscular, paralisia e eventual morte (He *et al.*, 2008).

Os resultados desta pesquisa confirmam que a exposição das abelhas ao Lambda-Cialotrina possui efeito letal significativo por meio da ingestão, bem como por contato tópico em *M. q. anthidioides*. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Motta *et al.* (2023), que avaliaram a toxicidade de uma formulação comercial do Lambda-Cialotrina e observaram que a ingestão de i.a. danificou células do intestino médio e induziu estresse oxidativo e morte em operárias da abelha sem ferrão *Partamona helleri*.

Os efeitos tóxicos observados no presente estudo também se assemelham aos relatados por Liao *et al.* (2018), que expuseram operárias de *A. mellifera* recém emergidas ao Lambda-Cialotrina por ingestão de alimento contaminado e observaram efeito significativo na sua sobrevivência. Além disso, a exposição a doses subletais realizada pelos mesmos autores, causaram efeitos subletais como: alterações no comportamento normal de retorno, aprendizado olfativo, capacidade de memória e habilidades cognitivas.

A exposição das abelhas aos agrotóxicos pode ocorrer de diferentes formas:

por via oral, contato ou inalação de partículas volatilizadas no ar (Boyle *et al.*, 2019). A aplicação de agrotóxicos em culturas pode causar deriva da pulverização, que pode contaminar os recursos de forrageamento e nidificação próximos, como flores silvestres, solo e água, levando à ingestão de pólen e néctar contaminados ou exposição ao contato direto de abelhas que pousam ou caminham em superfícies contaminadas (Boyle *et al.*, 2019; Rondeau; Raine, 2022).

A presença de resíduos de Lambda-Cialotrina no néctar e pólen de plantas, conforme identificado por Choudhary e Sharma (2008), sugere que as abelhas podem ser impactadas pela ingestão desse inseticida em seu ambiente natural. Ao ingerirem as moléculas do inseticida, o trato digestivo se torna o primeiro órgão em contato (Denecke *et al.*, 2018).

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que futuras pesquisas explorem mais a fundo os efeitos subletais causados Lambda-Cialotrina em *M. q. anthidioides*, especialmente na via de exposição por superfície de contato. Uma investigação mais detalhada sobre as alterações comportamentais observadas, possíveis alterações na atividade de enzimas e alterações na concentração de proteínas, poderia fornecer informações adicionais sobre os impactos do i.a. no organismo da abelha e o reflexo destes efeitos subletais para a sobrevivência e manutenção desta espécie.

4.2 Triflumizol

De modo geral, o i.a. Triflumizol não causou redução significativa na taxa de sobrevivência de *M. q. anthidioides* em nenhuma das três vias de exposição testadas. O menor percentual de sobrevivência observado foi na via de exposição tópica, no entanto, as concentrações testadas nesta via foram superiores às testadas nas demais vias de exposição.

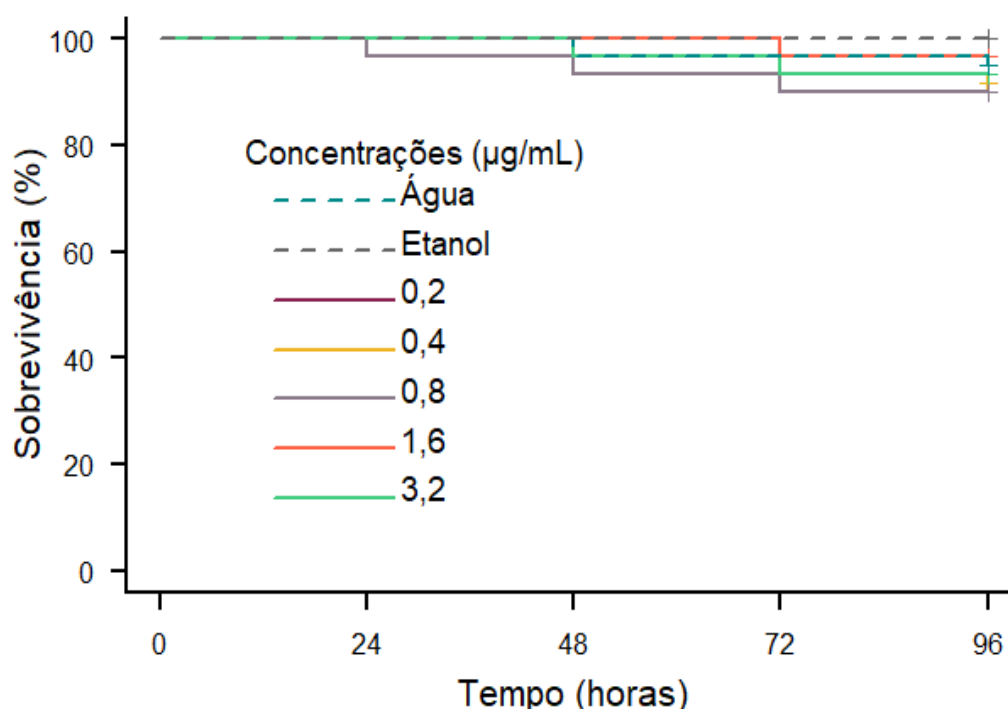
Na via de exposição por ingestão de alimento contaminado, a proporção de sobreviventes variou de 90% a 96,67%, dependendo da concentração do Triflumizol (Tabela 7). O teste de log-rank indicou que não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevivência dos tratamentos, portanto, as concentrações testadas não tiveram um efeito significativo na mortalidade das abelhas ($\chi^2= 4,5$; $gl=6$; $p= 0,6$) (Figura 14). Além disso, o teste de log-rank, aplicado com correção dos valores de p pelo método de Benjamini-Hochberg, não evidenciou diferença significativa entre os tratamentos controle, sugerindo que o diluente Etanol não influenciou na mortalidade

das abelhas ($p>0,05$).

Tabela 7. Percentual de abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Triflumizol por ingestão de alimento contaminado, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamentos	Proporção de sobreviventes (%)	Erro padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	93	4,55	[84,8; 100]
T2 (0,2 $\mu\text{g/mL}$)	96,65	3,39	[90,13; 100]
T3 (0,4 $\mu\text{g/mL}$)	90	5,48	[79,9; 100]
T4 (0,8 $\mu\text{g/mL}$)	90	5,48	[79,9; 100]
T5 (1,6 $\mu\text{g/mL}$)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T6 (3,2 $\mu\text{g/mL}$)	93,33	4,55	[84,8; 100]
T7 (Etanol)	100	-	-

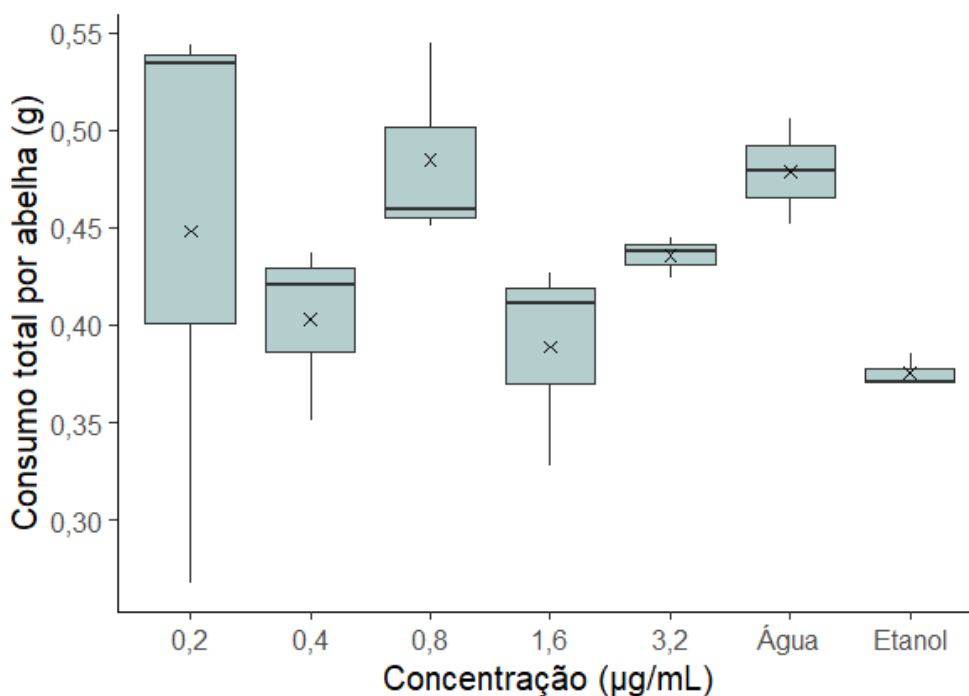
Figura 14. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* exposta ao Triflumizol por ingestão de alimento contaminado.



Com relação ao consumo de alimento das abelhas ao longo das 96 horas, não foram identificadas diferenças significativas na média de consumo total de

alimento por abelha entre os tratamentos, de acordo com a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($\chi^2 = 11,297$; $gl = 6$; $p = 0,07961$). Este resultado indica que a presença do i.a. no alimento das abelhas não causou repelência ao mesmo (Figura 15).

Figura 15. Gráfico de Boxplot para o consumo total de alimento por abelha campeira de *Melipona quadrifasciata anthidioides* de cada tratamento. O “x” no interior do gráfico indica a média de consumo total por abelha de cada tratamento.



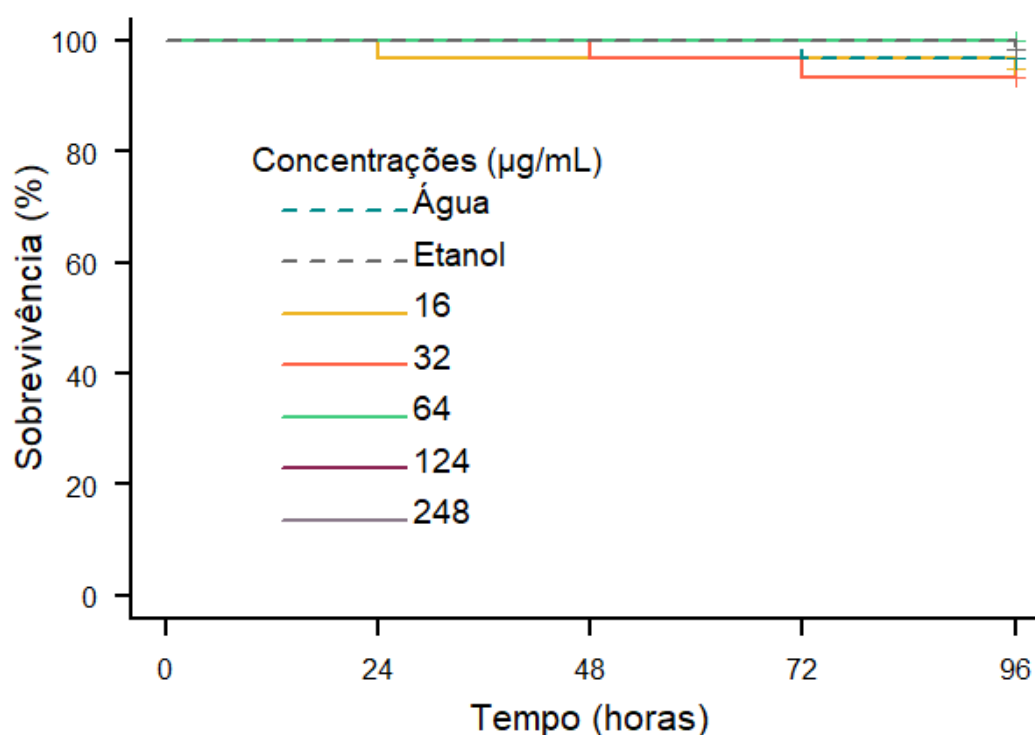
Para a via de exposição superfície de contato contaminada, os resultados indicaram que a sobrevivência das abelhas não foi afetada nas diferentes concentrações do Triflumizol. Os tratamentos com concentrações crescentes do i.a. apresentaram 100% de sobrevivência das abelhas, sugerindo que a exposição por meio da superfície de contato não é uma via efetiva de intoxicação letal do Triflumizol para *M. quadrifasciata anthidioides* (Tabela 8).

O teste de log-rank não indicou diferença significativa entre as curvas de sobrevivência das diferentes concentrações do i.a. ($\chi^2 = 5,9$; $GL = 6$; $p = 0,4$). Quando comparados os tratamentos controle pelo teste de log-rank com correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg, também não foram evidenciadas diferenças significativas ($p > 0,05$), confirmando que o diluente etanol não afetou a mortalidade das abelhas (Figura 16).

Tabela 8. Percentual de abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Triflumizol por contato a superfície contaminada, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamentos	Proporção de sobreviventes (%)	Erro padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T2 (16 $\mu\text{g/mL}$)	93,3	4,55	[84,8; 100]
T3 (32 $\mu\text{g/mL}$)	93,3	4,55	[84,8; 100]
T4 (64 $\mu\text{g/mL}$)	100	-	-
T5 (124 $\mu\text{g/mL}$)	100	-	-
T6 (248 $\mu\text{g/mL}$)	100	-	-
T7 (Etanol)	96,67	3,28	[90,45; 100]

Figura 16. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* exposta ao Triflumizol por contato a superfície contaminada.



Na via de exposição tópica, o tratamento com a dose mais baixa do Triflumizol (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) resultou em uma sobrevivência de 100%, enquanto doses maiores (100, 200 e 400 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) apresentaram sobrevivência de 96,67%, 95,83% e 72,4%, respectivamente. A dose mais alta do ingrediente ativo (600 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

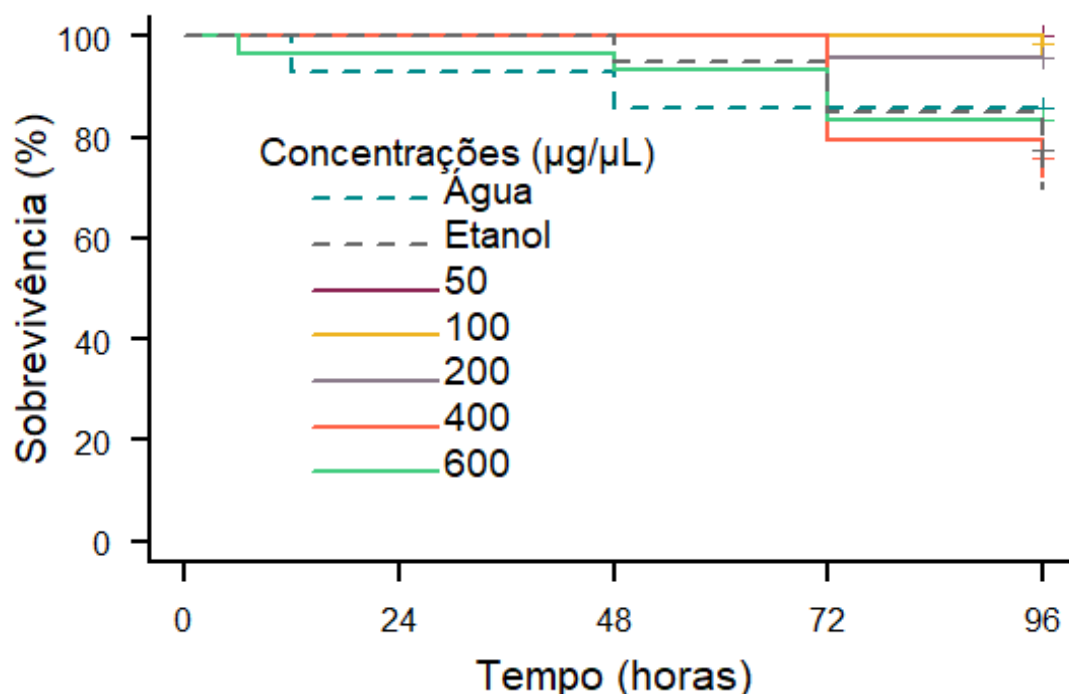
apresentou uma sobrevivência de 83,3% (Tabela 9).

Tabela 9. Percentual de abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Triflumizol por via tópica, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamentos	Proporção de sobreviventes (%)	Erro padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	85,7	9,35	[69,2; 100]
T2 (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	100	-	-
T3 (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T4 (200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	95,83	4,08	[88,16; 100]
T5 (400 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	72,4	8,30	[57,8; 90,7]
T6 (600 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	83,3	6,80	[71,0; 97,8]
T7 (Etanol)	70,0	10,25	[52,5; 93,3]

O teste de log-rank identificou diferença significativa entre as curvas de sobrevivência ($\chi^2 = 16,5$; $\text{gl} = 6$; $p = 0,01$). No entanto, quando comparados os pares de tratamentos pelo teste de log-rank com correção dos valores de p pelo método de Benjamini-Hocheberg, as diferenças significativas não foram evidentes, assim, considera-se que todos os tratamentos possuem curvas de sobrevivência iguais (Figura 17).

Figura 17. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* exposta ao Triflumizol por aplicação tópica.



Observou-se ainda que o tratamento controle solvente (etanol) apresentou a menor sobrevivência das abelhas, enquanto a exposição a água resultou em maior sobrevivência. No entanto, quando comparados os dois tratamentos controles pelo teste de log-rank com correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg, verificou-se que não houve diferença significativa entre os controles ($p=0,51$). Estes resultados indicam que o diluente não influenciou na mortalidade das abelhas em comparação ao tratamento controle com água.

O Triflumizol é um fungicida pertencente ao grupo químico dos Imidazóis, sua utilização é autorizada para diversas culturas cuja polinização é realizada por abelhas sem ferrão, a exemplo de melancia, maçã, manga, melão e pepino (Nicodemo *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2014; Wolowski *et al.*, 2019). Sua aplicação é principalmente direcionada ao controle de fungos causadores do oídio. Com relação a periculosidade ambiental, este produto classificado como muito perigoso ao meio ambiente (classe II), devido sua alta persistência no meio ambiente (Brasil, 2023)

Este fungicida atua principalmente inibindo a C14-desmetilase, uma enzima envolvida na biossíntese de esteroides, interferindo especificamente na CYP51.

(Iwasa *et al.*, 2004; Zarn; Brüscheweiler; Schlatter, 2003; Zhu *et al.*, 2014). Além disso, o Triflumizol demonstra a capacidade de inibir as enzimas CYP450s presentes em insetos, (Brattsten; Berger; Dungan, 1994). Essas enzimas possuem papel nos processos de desintoxicação e quimiorrecepção, ajudando a metabolizar xenobióticos em que as abelhas entram em contato (Berenbaum; Johnson, 2015), o que sugere um possível efeito tóxico causado por este fungicida aos insetos, especialmente as abelhas.

A exposição ao Triflumizol por meio das vias de exposição por ingestão de alimento contaminado e superfície de contato contaminada não apresentou efeito significativo na mortalidade das abelhas. Embora, na via de exposição tópica as doses maiores do composto resultaram em uma leve diminuição na sobrevivência das abelhas, as concentrações testadas foram elevadas e o percentual de mortalidade das abelhas não excedeu 30%. Deste modo, nas condições experimentais deste estudo, o Triflumizol não causou efeitos letais significativos nas abelhas em nenhuma das três vias testadas.

Os fungicidas geralmente são considerados pouco tóxicos para as abelhas, porém estudos recentes apontam que esses produtos podem ter efeitos subletais prejudiciais. Esses efeitos podem incluir estresse, redução do consumo de alimentos, metabolismo alterado, alterações morfofisiológicas no intestino médio e até mesmo diminuição da cognição e expectativa de vida das abelhas (Cullen *et al.*, 2019; Domingues *et al.*, 2020; Schuhmann *et al.*, 2022).

No presente estudo foram observadas alterações comportamentais nas abelhas expostas ao fungicida Triflumizol. Foi possível notar visualmente a ocorrência de comportamentos como agitação, desorientação, dificuldade de locomoção, prostração, autolimpeza corporal excessiva e agitação constante das asas. Estes resultados se assemelham com os obtidos por Tosi e Nieh (2017), que também observaram comportamentos anormais em abelhas intoxicadas com diferentes agrotóxicos.

Os agrotóxicos podem afetar negativamente a precisão das informações transmitidas pelas abelhas, além de prejudicar o comportamento de orientação das operárias expostas (Desneux *et al.*, 2007). Deste modo, as variações comportamentais observadas no presente estudo podem representar sinais de intoxicação subletal do i.a. para *M. quadrifasciata anthidioides* e merecem ser melhor investigados.

Além disso, diversos estudos relatam que os fungicidas quando aplicados em conjunto com inseticidas tem a capacidade potencializar o efeito tóxico dos inseticidas, o que pode ter implicações significativas para a saúde das abelhas e para a polinização em geral (Almeida *et al.*, 2021; Tomé *et al.*, 2017). A exemplo, os fungicidas inibidores da biossíntese de ergosterol, como é o caso do Triflumizol, podem modificar a toxicidade de inseticidas piretróides, como o Lambda-Cialotrina (Poquet; Vidau; Alaux, 2016).

O risco associado aos fungicidas para as abelhas não está relacionado especificamente ao efeito letal, mas sim às alterações metabólicas causadas pela exposição crônica a estes produtos (Rondeau; Raine, 2022), que por sua vez deixarão as abelhas mais susceptíveis a outros estressores. Desta forma, pesquisas futuras podem ser realizadas para investigar possíveis alterações metabólicas provocadas pelo i.a. nas abelhas sociais sem ferrão, bem como a avaliação da toxicidade deste fungicida associado outros i.a.

4.3 Fenpiroximato

Assim como o Triflumizol, o i.a. Fenpiroximato também não causou redução significativa na proporção de abelhas sobreviventes nas três vias de exposição testadas. Em todas as vias, o percentual de sobrevivência de *M. q. anthidioides* dos tratamentos que continham o i.a. não diferiram estatisticamente dos tratamentos controle. Deste modo, não foi possível determinar a DL₅₀ ou CL₅₀ do i.a. para a espécie de abelha estudada.

Na via de exposição por ingestão de alimento contaminado, as proporções de sobrevivência das abelhas de todos os tratamentos ficaram acima de 96% (Figura 18). O teste de log-rank aplicado não apontou diferença significativa entre as curvas de sobrevivência ($\chi^2 = 3$; gl= 5; $p=0,7$). Os tratamentos controle (água e solvente) tiveram a mesma proporção de sobrevivência (100%), confirmando que o solvente utilizado na diluição do i.a. não afetou a sobrevivência das abelhas (Tabela 10).

Figura 18. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* exposta ao Fenpiroximato por ingestão de alimento contaminado.

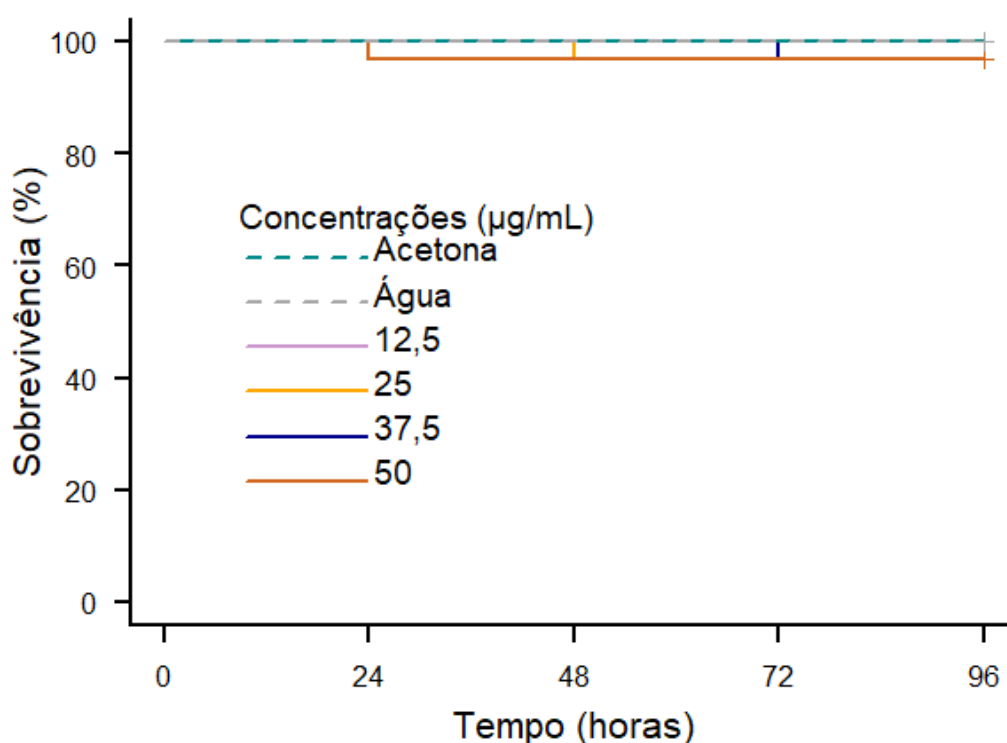


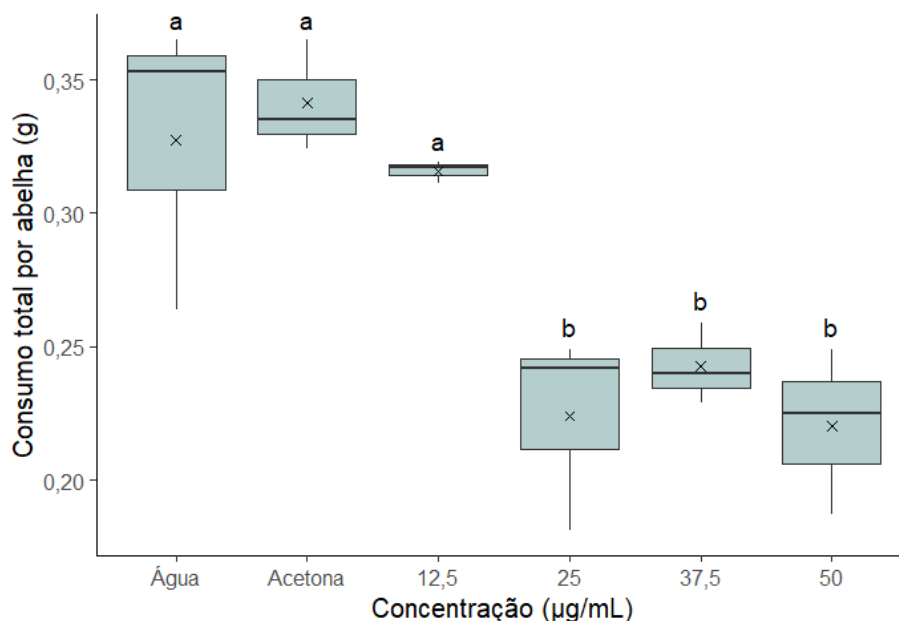
Tabela 10. Percentual de abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Fenpiroximato por ingestão de alimento contaminado, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamentos	Proporção de sobreviventes (%)	Erro padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	100	-	-
T2 (12,5 µg/mL)	100	-	-
T3 (25 µg/mL)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T4 (37,5 µg/mL)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T5 (50 µg/mL)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T6 (Acetona)	100	-	-

Com relação ao consumo de alimento pelas abelhas ao longo das 96 horas, pode-se observar uma redução significativa na média de consumo total de alimento por abelha a medida que houve aumento da concentração de i.a., conforme o teste F da análise de variância ($F_{(5,12)} = 9,0324$; $p < 0,01$). Este resultado, indica que a

presença do i.a. na solução de alimentação pode ter causado repelência às abelhas ao consumo de alimento, resultando em uma menor quantidade de alimento total consumida pelas abelhas expostas às maiores concentrações (Figura 19).

Figura 19. Gráfico de Boxplot para o consumo total de alimento por abelha de cada tratamento. O “x” no interior do gráfico indica a média de consumo total por abelha de cada tratamento. Caixas seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de 5% de significância.

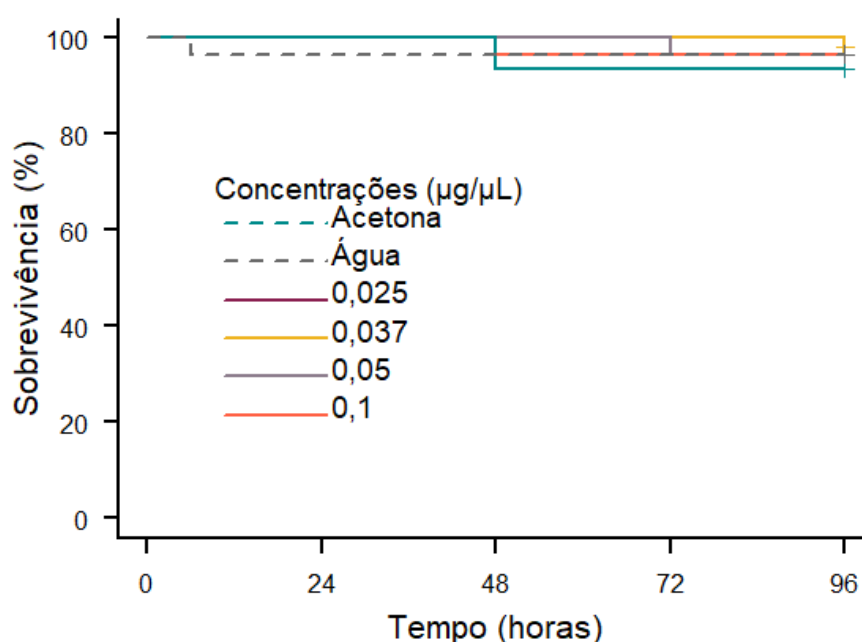


Na via de exposição por aplicação tópica, todos os tratamentos resultaram em um percentual de sobrevivência acima de 93%. Todas as concentrações do i.a. Fenpiroximato resultaram em 96,67% de sobrevivência das abelhas testadas (Tabela 11). De acordo com o teste de log-rank, as curvas de sobrevivência foram idênticas ($\chi^2 = 0,7$; $gl = 5$; $p = 1$). Além disso, os dois tratamentos controles não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de log-rank com correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg ($p > 0,05$), confirmando que o solvente utilizado para diluição do i.a. não influencia na mortalidade das abelhas (Figura 20).

Tabela 11. Percentual de abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Fenpiroximato por aplicação tópica, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamentos	Proporção de sobreviventes (%)	Erro padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T2 (0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T3 (0,037 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T4 (0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T5 (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T6 (Acetona)	93,55	4,41	[85,29; 100]

Figura 20. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* exposta ao Fenpiroximato por aplicação tópica.

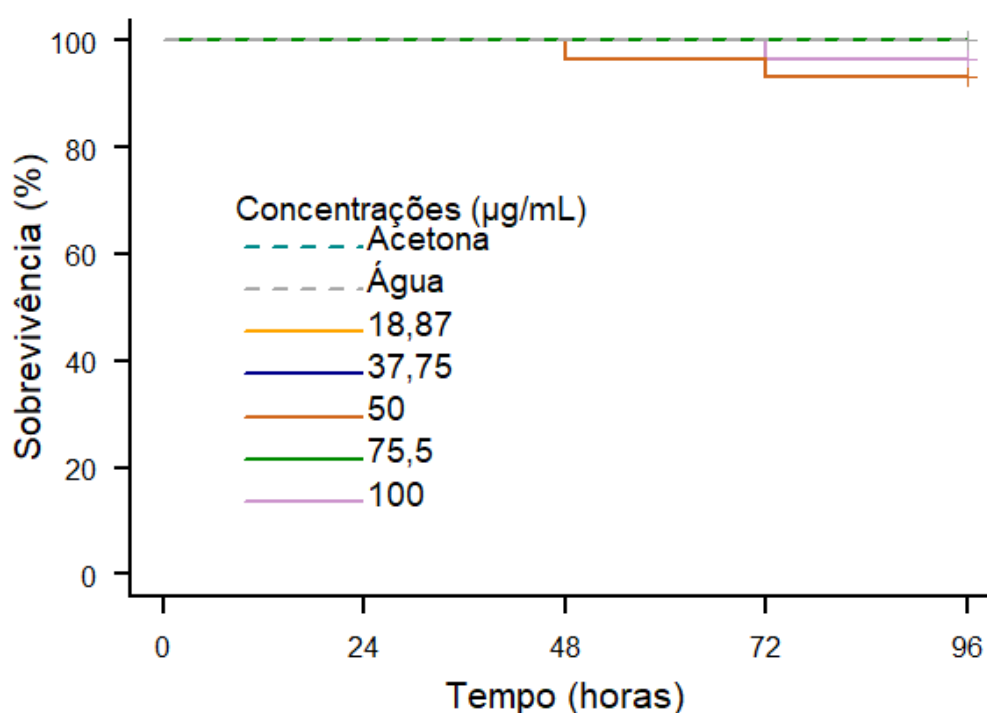


Na via de exposição por superfície de contato contaminada, as curvas de sobrevivência dos tratamentos testados não diferiram estatisticamente entre si de acordo com o teste de log-rank ($\chi^2 = 8,9$; $gl = 6$; $p = 0,2$). Os tratamentos controles água e diluente (Acetona), mantiveram 100% de sobrevivência das abelhas testadas após 96 horas de exposição (Tabela 12). Todas as concentrações de i.a. testadas resultaram em um percentual de sobrevivência acima de 93% (Figura 21).

Tabela 12. Percentual de abelhas campeiras de *Melipona quadrifasciata anthidioides* sobreviventes após exposição a diferentes concentrações do Fenpiroximato por contato a superfície contaminada, erro padrão e intervalo de confiança.

Tratamentos	Proporção de sobreviventes (%)	Erro padrão	IC para μ (95%)
T1 (Água)	100	-	-
T2 (18,87 $\mu\text{g/mL}$)	100	-	-
T3 (37,75 $\mu\text{g/mL}$)	100	-	-
T4 (50 $\mu\text{g/mL}$)	93,3	4,55	[84,80; 100]
T5 (75,5 $\mu\text{g/mL}$)	100	-	-
T6 (100 $\mu\text{g/mL}$)	96,67	3,28	[90,45; 100]
T7 (Acetona)	100	-	-

Figura 21. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier a partir do tempo de exposição (horas) para *Melipona quadrifasciata anthidioides* exposta ao Fenpiroximato por contato a superfície contaminada.



O Fenpiroximato é um acaricida pertencente ao grupo químico Pirazol, no Brasil é amplamente utilizado para o controle de ácaros em diversos cultivos agrícolas. O Fenpiroximato atua inibindo o transporte de elétrons mitocondriais no sítio NADH-coenzima Q redutase dos ácaros (Dekeyser, 2004; EFSA, 2016;

Lümmen, 1998). As formulações comerciais deste produto apresentam classificação de periculosidade ambiental como muito perigoso ao meio ambiente (classe II), por ser altamente bioconcentrável e tóxico para organismos aquáticos e edáficos (Brasil, 2023).

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de avaliar a eficiência da utilização deste i.a. para o controle de *Varroa destructor*, um importante ácaro ectoparasita de *A. mellifera* (Bahreini *et al.*, 2020; Bahreini *et al.*, 2022; Johnson *et al.*, 2013), devido a sua baixa toxicidade letal para abelhas, como já observado em outros estudos (Darwish; Ali; Aly, 2022; Leite *et al.*, 2018).

No presente estudo, as concentrações testadas do i.a. não ocasionaram em um aumento significativo da mortalidade das abelhas. Em todas as três vias de exposição testadas o percentual de sobrevivência permaneceu acima de 90%, tanto nos tratamentos controles quanto nos tratamentos com exposição ao Fenpiroximato. Apesar de não ter sido observado efeito letal significativo nas abelhas, foram observadas alterações comportamentais, como agitação, desorientação, prostração, autolimpeza corporal excessiva, dificuldade de locomoção e agitação constante de asas.

Além das alterações comportamentais observadas nas abelhas, os resultados desta pesquisa evidenciaram uma redução significativa no consumo total de alimento por abelha na via de exposição por ingestão de alimento contaminado. Este resultado pode representar um efeito subletal significativo deste i.a. para as abelhas, podendo estar associado a deficiência de aprendizagem e retenção de memória ou a repelência das abelhas à fonte de alimentação contaminada.

A redução no consumo de alimento pelas abelhas pode estar relacionada ao mecanismo de ação do Fenpiroximato, que atua na cadeia de transporte de elétrons mitocondriais. Uma hipótese para a ocorrência deste efeito é que o Fenpiroximato pode ter inibido a atividade da enzima citocromo C oxidase e a inibição desta enzima no sistema nervoso central pode estar associada a deficiência de aprendizagem, prejudicando a retenção de memória das abelhas à fonte de alimento (Bennet *et al.*, 1996; Gashout *et al.*, 2020). No entanto, esta hipótese precisa ser testada em novos estudos. Assim como neste estudo, outros autores também relataram baixa toxicidade letal do Fenpiroximato para abelhas. Dahlgren *et al.* (2012) relataram baixa toxicidade letal para *A. mellifera*, assim como Darwish, Ali e Aly (2022), que observaram percentual de mortalidade abaixo de 30% nas maiores concentrações

testadas. Em outro estudo, a maior dosagem recomendada de um produto formulado com Fenpiroximato resultou em baixa mortalidade de *A. mellifera*, porém foram observados efeitos secundários, como alterações na coordenação motora e agitação, quando o i.a. foi combinado com óleo mineral (Leite *et al.*, 2018).

Apesar das alterações comportamentais observadas em algumas circunstâncias, a letalidade do Fenpiroximato para as abelhas é relativamente baixa quando comparada a outros acaricidas testados em estudos de toxicologia com abelhas (Dahlgren *et al.*, 2012; Darwish, Ali e Aly 2022; Leite *et al.*, 2018).

A possível resistência das abelhas ao Fenpiroximato pode ser explicada pelos processos metabólicos de desintoxicação celular que são desencadeados nas abelhas, quando expostas a este i.a. A desintoxicação por enzimas P450s parece ser a base para a tolerância que as abelhas mostram em relação ao Fenpiroximato, conforme discutido por Johnson *et al.* (2013). No entanto, no mesmo estudo foi observado que o efeito tóxico do Fenpiroximato pode ser alterado caso a exposição seja combinada com fungicidas inibidores da biossíntese de esterol, que por sua vez são capazes de inibir a desintoxicação mediada pela P450s.

Resíduos de Fenpiroximato foram detectados em amostras de cera, pólen e mel de *A. mellifera* (Bargańska; Ślebioda; Namieśnik, 2013; El Agrebi *et al.*, 2020; Kiljanek, 2024; Marti; Kilchenmann; Kast, 2022). Estes produtos são comumente utilizados em atividades de manejo de abelhas sociais sem ferrão, seja no fornecimento de cera ou na suplementação alimentar, fornecendo o mel como alimento energético ou bombom de pólen apícola como alimento proteico. Assim, as ASSF podem ser expostas a resíduos deste i.a., representando um possível risco, caso seja utilizado no controle de ectoparasitas em *A. mellifera*.

Embora um único i.a. em certas concentrações não seja letal, a exposição combinada a múltiplos i.a. ou outros estressores pode ter efeitos sinérgicos, aumentando os riscos para as abelhas. Os agrotóxicos podem interagir entre si durante a desintoxicação, causando competição entre substâncias tóxicas e prejudicando esse processo. Ou seja, várias substâncias tóxicas precisam ser removidas ao mesmo tempo, o que pode atrapalhar o processo de desintoxicação de cada uma delas (Poquet; Vidau; Alaux, 2016).

Ao considerar o contexto mais amplo da exposição a múltiplos estressores, é relevante investigar a interação entre Triflumizol e Fenpiroximato para avaliar potenciais efeitos sinérgicos provocados por uma exposição combinada. Essa

análise é importante para entender os riscos reais que esses compostos podem representar para as abelhas quando presentes simultaneamente no ambiente. Como ambos os i.a., embora não letais, provocaram alterações comportamentais, uma avaliação conjunta pode revelar se esses efeitos se intensificam ou se atenuam quando as abelhas são expostas a ambos os compostos simultaneamente.

5. CONCLUSÕES

O ingrediente ativo Lambda-Cialotrina (inseticida) é altamente tóxico para *Melipona quadrifasciata anthidioides* nas vias de exposição por ingestão de alimento contaminado e aplicação tópica, afetando a sobrevivência e comportamento das abelhas. Na via de exposição por superfície de contato contaminada o Lambda-Cialotrina não causou efeito letal significativo, mas causou paralisia e dificuldade de locomoção nas abelhas nas primeiras 24 horas de exposição, representando um risco a sobrevivência das abelhas. Os ingredientes ativos Triflumizol (Fungicida) e Fenpiroximato (Acaricida), apesar de não terem sido letais para as abelhas, provocaram alterações comportamentais evidentes, especialmente o Fenpiroximato que provocou uma redução significativa no consumo de alimento pelas abelhas.

6. REFERÊNCIAS

- ABATI, R.; SAMPAIO, A.R.; MACIEL, R. M. A.; COLOMBO, F. C.; LIBARDONI, G.; BATTISTI, L.; LOZANO, E. R.; GHISI, N. C.; COSTA-MAIA, F. M.; POTRICH, M. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 32282–32298, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14224-7>
- ABRAHAM, J.; BENHOTONS, G. S.; KRAMPAR, I.; TAGBA, J.; AMISSAH, C.; ABRAHAM, J. D. Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 166, n. 8, p. 695–702, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/eea.12694>
- AGUIAR, J. M. R. B. V.; NOCELLI, R. C. F.; GIURFA, M.; NASCIMENTO, F. S. Neonicotinoid effects on tropical bees: Imidacloprid impairs innate appetitive responsiveness, learning and memory in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Science of the Total Environment**, v. 877, p.162859, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162859>
- ALMEIDA, C. H. S.; HADDI, K.; TOLEDO, P. F. S.; REZENDE, S. M.; SANTANA, W. C.; GUEDES, R. N. C.; NEWLAND, P. L. Sublethal agrochemical exposures can alter honey bees' and Neotropical stingless bees' color preferences, respiration rates, and locomotory responses. **Science of the Total Environment**, v. 779, p. 146432, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146432>
- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, CARLOS A. L.; WALDSCHMIDT, A. M.; PAIXAO, J. F.; SOUZA, B. A.; SANTOS, L. O. F.; SODRÉ, G. S.; SOUSA, I. C.; SILVA, E. P.; OLIVEIRA, M. P. **Melipona mandacaia** Smith, 1863: a abelha da caatinga do Velho Chico. 1. ed. Curitiba-PR: CRV, 2016. v. 1. 248p. (Série Meliponicultura; 9)
- ALVES, R. M. O.; ANDRADE, M. A. P.; CARVALHO-ZLISE, G. A.; WALDSCHMIDT, A. M.; CARVALHO, C. A. L.; RIBEIRO, G. S.; VILAS BOAS, H. C.; OLIVEIRA, M. P.; VASCONCELOS, B. M.; ROCHA, M. A. S.; LOPES, E. S.; FILHO, I. R. S.; MALHEIRO, E. O.; PEREIRA JUNIOR, J. **Guia de identificação de abelhas sem ferrão da Bahia**. Curitiba: CRV, 2021. 184p.
- BADOWSKA, B. J.; DZIKOWSKA, Z. I.; GWOREK, B.; KACPRZYK, W.; CHMIELEWSKI, J. The role and significance of stingless bees (Hymenoptera: Apiformes: Meliponini) in the natural environment. **Environmental Protection and Natural Resources**, v. 30, n. 2, p 1-5, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2478/oszn-2019-0005>
- BAHREINI, R.; NASR, M.; DOCHERTY, C.; HERDT, O.; MUIRHEAD, S.; FEINDEL, D. Evaluation of potential miticide toxicity to *Varroa destructor* and honey bees, *Apis mellifera*, under laboratory conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n.1, p.21529. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78561-2>
- BAHREINI, R.; NASR, M.; DOCHERTY, C.; MUIRHEAD, S.; HERDT, O.; FEINDEL, D. Miticidal activity of Fenazaquin and Fenpyroximate against *Varroa destructor*, an ectoparasite of *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, v.78, n.4, p.1686-1697,

2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.6788>

BARBOSA, D. B.; CRUPINSKI, E. F.; SILVEIRA, R. N.; LIMBERGER, D. C. H. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n. 4, p. 694–703, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21674/2448-0479.34.694-703>

BARBOSA, W. F.; TOMÉ, H. V. V.; BERNARDES, R. C.; SIQUEIRA, M. A. L.; SMAGGHE, G.; GUEDES, R. N. C. Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 9, p. 2149–2158, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.3053>

BARGAŃSKA, Ż.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 196–201, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.049>

BARTELLI, B. F.; NOGUEIRA-FERREIRA, F. H. Pollination Services Provided by *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini) in Greenhouses with *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 510–516, 2014. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.510-516>

BARTH, O. M.; FREITAS, A. S.; VANDERBORGHT, B. Pollen preference of stingless bees (*Melipona rufiventris* and *M. quadrifasciata anthidioides*) inside an urban tropical forest at Rio de Janeiro city. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p.1005-1010, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1714863>

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>

BENNETT, M. C.; MLADY, G. W.; FLESHNER, M.; ROSE, G. M. Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, n.3, p.1330-1334, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1330>

BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 51-58, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.005>

BOTINA, L. L.; BERNARDES, R. C.; BARBOSA, W. F.; LIMA, M. A. P.; GUEDES, R. N. C.; MARTINS, G. F. Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). **MethodsX**, v. 7, p. 100906, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100906>

BOYLE, N. K.; PITTS-SINGER, T. L.; ABBOTT, J.; ALIX, A.; COX-FOSTER, D. L.; HINAREJOS, S.; LEHMANN, D. M.; MORANDIN, L.; O'NEILL, B.; RAINE, N. E.; SINGH, R.; THOMPSON, H. M.; WILLIAMS, N. M.; STEEGER, T. Workshop on

Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Non-Apis Bees: Foundation and Summaries. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 4–11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/nvy103>

BRASIL. **Lei Nº 14.785, de 27 de dezembro de 2023**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental, de seus produtos técnicos e afins; revoga as Leis nºs 7.802, de 11 de julho de 1989, e 9.974, de 6 de junho de 2000, e partes de anexos das Leis nºs 6.938, de 31 de agosto de 1981, e 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2023-2026/2023/Lei/L14785.htm. Acesso em: 02 de fev. de 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Sistema de agrotóxico e fitossanitário**. Registro agrotóxico. 2023. Website. Disponível em: <https://indicadores.agricultura.gov.br/agrofit/index.htm>. Acesso em: 04 de nov de 2023.

BRATTSTEN, L. B.; BERGER, D. A.; DUNGAN, L. B. *In Vitro* Inhibition of Midgut Microsomal P450s from *Spodoptera eridania* Caterpillars by Demethylation Inhibitor Fungicides and Plant Growth Regulators. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 48, n. 3, p. 234–243, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1006/pest.1994.1025>

BRITO, P.; ELIAS, M.; SILVA-NETO, C.; SUJII, E.; SILVA, D.; GONÇALVES, B.; FRANCESHINELLI, E. The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 38654-38661, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08530-9>

BUENO, F. G. B.; KENDALL, L.; ALVES, D. A.; TAMARA, M. L.; HEARD, T.; LATTY, T.; GLOAG, R. Stingless bee floral visitation in the global tropics and subtropics. **Global Ecology and Conservation**, v.43, p. e02454, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02454>

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: MOURE, J. S. URBAN, D.; MELO, G. A. R. (org.). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the **Neotropical Region-online version**. 2013. Disponível em: <http://moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 14 de dez. de 2023.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(06\)70012-2](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70012-2)

CHAM, K. O.; NOCELLI, R. C. F.; BORGES, L. O.; VIANA-SILVA, F. E. C.; TONELLI, C. A. M.; MALASPINA, O.; MENEZES, C.; ROSA-FONTANA, A. S.; BLOCHETIN, B.; FREITAS, B. M.; PIRES, C. S. S.; OLIVEIRA, F. F.; CONTRERA, F. A. L.; TOREZANI, K. R. S.; RIBEIRO, M. F.; SIQUEIRA, M. A. L.; ROCHA, M. C.

L. S. A. Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees.

Environmental Entomology, v. 48, n. 1, p. 36-48, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1093/ee/nvy137>

CHAM, K. O.; REBELO, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; FERRO, A. A.; SILVA, F. E. C. V.; BORGES, L. O.; SARETTO, C. O. S. D.; TONELLI, C. A. M.; MACEDO, T. C.

Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília: Ibama/Diqua, 2017. 105p.

CHOUDHARY, A., SHARMA, D.C. Dynamics of pesticide residues in nectar and pollen of mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern.) grown in Himachal Pradesh (India). **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 144, p.143–150. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10661-007-9952-3>

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. e0225743, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225743>

CUNHA, D. A. S.; NÓBREGA, M. A. S.; JÚNIOR, W. F. A. Insetos polinizadores em sistemas agrícolas. **Ensaios Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 18, n. 4, p. 185-194, 2014.

DAHLGREN, L.; JOHNSON, R. M.; SIEGFRIED, B. D.; ELLIS, M. D. Comparative Toxicity of Acaricides to Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Workers and Queens. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 6, p. 1895-1902, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1603/EC12175>

DARWISH, M. G.; ALI, A. M.; ALY, M. F. K. Study the Influence of Three Acaricides on Honeybee Workers *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) under Laboratory Conditions. **Journal of Plant Protection and Pathology**, v. 13, n. 8, p. 185-189, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21608/JPPP.2022.145931.1084>

DAVIES, T. G. E.; FIELD, L. M.; USHERWOOD, P. N. R.; WILLIAMSON, M. S. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. **IUBMB life**, v. 59, n. 3, p.151-162, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/15216540701352042>

DEKEYSER, M. A. Acaricide mode of action. **Pest Management Science**, v. 61, n. 2, p. 103-110, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.994>

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

DENECKE, S.; SWEVERS, L.; DOURIS, V.; VONTAS, J. How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium?. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.103, p.22-35, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.005>

DESNEUX, N., DECOURTYE, A., DELPUECH, J.-M.M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.52, p. 81-106. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>

DOMINGUES, C. E. C.; INOUE, L. V. B.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111395, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111395>

DUFFUS, J. Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993). **Pure and Applied Chemistry**, v. 65, n. 9, p. 2003-2122, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1351/pac199365092003>

EFSA, E. F. S. A. Review of the existing maximum residue levels for fenpyroximate according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. **EFSA Journal**, v. 14, n. 1, 2016. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4382>

EL AGREBI, N.; TRAYNOR, K.; WILMART, O.; TOSI, S.; LEINARTZ, L.; DANNEELS, E.; GRAAF, D. C.; SAEGERMAN, C. Pesticide and veterinary drug residues in Belgian beeswax: occurrence, toxicity, and risk to honey bees. **Science of the Total Environment**, v.745, p.141036. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141036>

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Databases and Data-Sets**. 2023. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 04 de nov de 2023.

FELTRON, J. C.; OOMEN, P. A.; STEVENSON, J. H. Toxicity and Hazard of Pesticides to Honeybees: Harmonization of Test Methods. **Bee World**. v. 67, n.3, p.114-124. 1986. DOI: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1986.11098883>

FERREIRA E. B.; CAVALCANTI P. P.; NOGUEIRA D. A. **_ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portugues)_**. R package version 1.2.2. 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>. Acesso em 10 de dez de 2023.

FRANÇA, R. R. F.; CARVALHO, A. S.; BRANCO, F. S. C.; PINTO, A. C.; BOECHAT, N. Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14 α -desmetilase Contra *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual de Química**. v. 6, n. 5, p.1483-1516, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140096>

GAMA, A. F.; DE OLIVEIRA, A. HB; CAVALCANTE, R. M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Química Nova**, v. 36, n.3, p. 462-467, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000300017>

GASHOUT, H. A.; GUZMAN-NOVOA, E.; GOODWIN, P. H.; CORREA-BENÍTEZ, A. Impact of sublethal exposure to synthetic and natural acaricides on honey bee (*Apis mellifera*) memory and expression of genes related to memory. **Journal of Insect Physiology**, v.121, p.104014, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104014>

GIANNINI, T. C.; ALVES, D. A.; ALVES, R.; CORDEIRO, G. D.; CAMPBELL, A. J.; AWADE, M.; BENTO, J. M. S.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. **Apidologie**, v.51, p.406–421, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00727-3>

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO, 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, 2015a. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>

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, 2015b. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/tov093>

GODOY NETTO, A. V.; FREM, R. C. G.; MAURO, A. E. A química supramolecular de complexos pirazólicos. **Química Nova**, v. 31, n.5, p. 1208-1217, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500050>

GUPTA, P. K. **Illustrated toxicology**: with study questions. Academic Press, 2018. 630p.

HAFAEEZ, M.; LI, X.; ZHANG, Z.; HUANG, J.; WANG, L.; ZHANG, J.; SHAH, S.; KHAN, M.M.; XU, F.; FERNÁNDEZ-GRANDON, G.M.; ZALUCKY, M. P.; LU, Y. De Novo Transcriptomic Analyses Revealed Some Detoxification Genes and Related Pathways Responsive to Noposion Yihaogong® 5% EC (Lambda-Cyhalothrin 5%) Exposure in *Spodoptera frugiperda* Third-Instar Larvae. **Insects**, v. 12, n. 132, p.1-16. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects12020132>

HE, L. M.; TROIANO, J.; WANG, A.; GOH, K. Environmental Chemistry, Ecotoxicity, and Fate of Lambda-Cyhalothrin. In: WHITACRE, D. M. (ed). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. vol 195. Springer, New York, NY. 2008. DOI: https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7_3

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 12 de dez. de 2023.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A. A.; SARAIVA, A. M. (Orgs.) **Polinizadores no Brasil**: Contribuição e Perspectivas para a Biodiversidade, Uso Sustentável, Conservação e Serviços Ambientais. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012. 488 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços

ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 59-62, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000400008>.

IWASA, T.; MOTOYAMA, N.; AMBROSE, J. T.; ROE, R. M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, v. 23, n. 5, p. 371–378, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>

JAFFÉ, R.; POPE, N.; CARVALHO, A. T.; MAIA, U. M.; BLOCHTEIN, B.; CARVALHO, C. A. L.; CAHVALHO-ZILSE, G. A.; FREITAS, B. M.; MENEZES, C.; RIBEIRO, M. F.; VENTUERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **PloS One**, v.10, n.6, p. e0121157, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121157>

JOHNSON, R. M.; DAHLGREN, L.; SIEGFRIED, B. D.; ELLIS, M. D. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). **PloS One**, v. 8, n. 1, p. e54092, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054092>

KARAM, D.; SILVA, W. T.; RIOS, J. N. G.; FERNANDES, R. C. **Agrotóxicos**. Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 28p. Documentos 192. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1039789/1/doc192.pdf>. Acesso em: 12 de dez. de 2023.

KARROUCHI, K.; RADI, S.; RAMLI, Y.; TAOUFIK, J.; MABKHOT, Y. N.; AL-AIZARI, F. A.; ANSAR, M. Synthesis and pharmacological activities of pyrazole derivatives: A review. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 134, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23010134>

KASSAMBARA, A.; KOSINSKI, M.; BIECEK, P. **_survminer**: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.9. 2021. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>. Acesso em: 10 de dez. de 2023.

KASSAMBARA A. **_rstatix**: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. R package version 0.7.2. 2023. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>. Acesso em: 10 de dez de 2023.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A.; BEGO, L. R.; ALVES, R. M. O.; MARTINS, M. A. S.; SOUZA, I. C. **Abelha Uruçu**: Biologia, Manejo e Conservação. Belo Horizonte, MG: Acangaú, 1996. 154p.

KILJANEK, T. Application of 3D-printed pollen traps as a useful tool for exposure and risk assessment of pesticide residues on bumblebees. **Chemosphere**, v.348, p. 140748, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140748>

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**, v. 281, p.20132440, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2440>

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. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>

LEITE, D. T.; SAMPAIO, R. B; CHAMBÓ, E. D.; AGUIAR, C. M. L.; GODOY, M. S.; CARVALHO, C. A. L. Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, p. 435-443, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00560-1>

LEITE, D. T.; SAMPAIO, R. B; SANTOS, C. O.; SANTOS, J. N.; CHAMBÓ, E. D.; CARVALHO, C. A. L.; SODRÉ, G. S. Toxicity of Fenpyroximate, Difenoconazole and Mineral Oil on *Apis mellifera* L. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 737-743, 2018. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3416>

LI, M.; WANG, J.; LU, Z.; WEI, D.; YANG, M.; KONG, L. NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*). **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 82-92, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.024>

LIAO, C.; HE, X.; WANG, Z.; BARRON, A. B.; ZHANG, B.; ZENG, Z.; WU, X. Short-term exposure to lambda-cyhalothrin negatively affects the survival and memory-related characteristics of worker bees *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, p. 59-65, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0514-1>

LIMA, M. A. P.; MARTINS, G. F.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, n. 9, p. 733-747, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1110-3>

LIU, X. Y.; SUN, H. M.; LUO, Y. H.; LI, M. Y.; LIU, H. B.; LIU, S. Identification of 14 glutathione S-transferase genes from *Lasioderma serricorne* and characterization of LsGSTe1 involved in lambda-cyhalothrin detoxification. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 193, p. 105425, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105425>

LOURENCETTI, A. P. S.; AZEVEDO, P.; MIOTELO, L.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Surrogate species in pesticide risk assessments: Toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, p. 120842, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120842>

LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Determination of fipronil LD50 for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 437, p. 174-178, 2012. DOI: <https://doi.org/10.5073/jka.2012.437.046>

LÜMMEN, P. Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. **Biochimica et**

Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, v. 1364, n. 2, p. 287-296, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00034-6)

LUZ, C. F. P.; FIDALGO, A. D. O.; SILVA, S. A. Y.; RODRIGUES, S. D. S.; NOCELLI, R. C. F. Floral resources and risk of exposure to pesticides for *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier 1836 in a Cerrado of São Paulo (Brazil). **Grana**, v. 57, n. 5, p.377-400, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173134.2018.1433716>

MARTI, J. N. G.; KILCHENMANN, V.; KAST, C. Evaluation of pesticide residues in commercial Swiss beeswax collected in 2019 using ultra-high performance liquid chromatographic analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v.29, p.32054-32064, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18363-9>

MENDES, C. R. A.; MENDES, C. E. P.; SANTOS, F. S. E.; LUZ, K. S. R.; SANTANA, L. P. Agrotóxicos: principais classificações utilizadas na agricultura brasileira-uma revisão de literatura. **Revista Maestria**, v. 17, p. 95-107, 2019.

MONTENEGRO, M.; SIMONI, J (Org.). **Atlas dos insetos**: fatos e dados sobre as espécies mais numerosas da Terra. Rio de Janeiro : Fundação Heinrich Böll, 2021. 58 p.

MOTTA, J.V.D.O.; CARNEIRO, L.S.; MARTÍNEZ, L.C.; BASTOS, D.S.S.; RESENDE, M.T.C.S.; CASTRO, B.M.C.; NEVES, M.M.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Midgut Cell Damage and Oxidative Stress in *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae) Workers Caused by the Insecticide Lambda-Cyhalothrin. **Antioxidants**, v. 12, n. 8. p.1510, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox12081510>

NASCIMENTO, A. S.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L.; ARAÚJO, D. F. D.; SILVEIRA, T. A. Pollen spectrum os stingless bees honey (Hymenoptera: Apidae), Paraná Satate, Brazil. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 3, n. 2, p. 290-296, 2015.

NASCIMENTO, L.; MELNYK, A. A química dos pesticidas no meio ambiente e na saúde. **Revista Mangaio Acadêmico**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2016.

NATH, R.; SINGH, H.; MUKHERJEE, S. Insect pollinators decline: an emerging concern of Anthropocene epoch, **Journal of Apicultural Research**, v.62, n.1, p.23-38, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2088931>

NICODEMO, D.; MALHEIROS, E. B.; DE JONG, D.; COUTO, R. H. N. Enhanced production of parthenocarpic cucumbers pollinated with stingless bees and Africanized honey bees in greenhouses. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3625-3634, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl1p3625>

NOCELLI, R. C. F.; SOARES, S. M. M.; MONQUERO, P. A. Effects of herbicides on the survival of the brazilian native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Planta Daninha**, v. 37, p. e019220193, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582019370100156>

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de Abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo : Editora Nogueirapis, 1997. 445 p.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Test No. 213:** Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. 1998a. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264070165-en>

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Test No. 214:** Honeybees, Acute Contact Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. 1998b. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264070189-en>

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Test No. 237:** Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264203723-en>

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Test No. 245:** Honey Bee (*Apis Mellifera* L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1787/9789264284081-en>

OLIVEIRA, F. F.; RICHERS, B. T. T.; SILVA, J. R.; FARIAS, R. C.; MATOS T. A. L. **Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Tefé: IDSM, 2013. 267 p.

OLIVEIRA-ABREU, C.; HILÁRIO, S. D.; LUZ, C. F. P.; SANTOS, I. A. Pollen and nectar foraging by *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in natural habitat. **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 441-448, 2014. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.441-448>

PADILHA, A. C.; PIOVESAN, B.; MORAIS, M. C.; PAZINI, J. B.; ZOTTI, M. J.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A. D. Toxicity of insecticides on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Friese) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Ecotoxicology**, v. 29, p. 119-128, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02150-x>

PEDRO, S. R. DE M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>

PINHEIRO, A.; MORAES, J. C. S.; SILVA, M. R. Pesticidas no perfil de solos em áreas de plantação de cebolas em Ituporanga, SC. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 5, p. 533-538, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662011000500015>

PIOVESAN, B.; PADILHA, A. C.; MORAIS, M. C.; BOTTON, M.; GRÜTZMACHER, A. D.; ZOTTI, M. J. Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees

Melipona quadrifasciata and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 42472-42480, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10191-7>

PIRES, C. S. S.; TOREZANI, K. R. S. **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos**. Ibama ed. Brasília: DF. 2018.

POQUET, Y.; VIDAUD, C.; ALAUX, C. Modulation of pesticide response in honeybees. **Apidologie**, v.47, p.412-426, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0429-7>

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

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H. T.; AIZEN, M. A.; BIESMEIJER, J. C.; BREEZE, T. D.; DICKS, L. V.; GARIBALDI, L. A.; HILL, R.; SETTELE, J.; VANBERGEN, A. J. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v.540, p.220-229, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature20588>

PRADO, F. S. R.; SANTOS, D. M.; OLIVEIRA, T. M. A.; BURGARELLI, J. A. M.; CASTELE, J. B.; VIEIRA, E. M. Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 via oral and topic acute exposure. **Environmental Pollution**, v. 265, Part B, p. 114313, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114313>

PRADO-SILVA, A.; NUNES, L. A.; SANTOS, J. M.; AFFONSO, P. R. A. M.; WALDSCHMIDT, A. M. Morphogenetic Alterations in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae) Associated with Pesticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 4, p. 627-632, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0509-y>

QUAZADA-EUÁN, J. J. G.; NATES-PARRA, G.; MAUÉS, M. M.; ROUBIK, D. W.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The economic and cultural values of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 534-557, 2018. DOI: <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3447>

R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 12 de dez. de 2023.

RADAESKI, J. N.; BAUERMANN, S. G. Contributions to melissopalynology studies in southern Brazil: pollen analysis in the honeys from *Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Plebeia remota* and *Plebeia droryana*. **Palynology**, v. 45, n. 3, p. 477-486, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/01916122.2020.1869113>

RADAESKI, J. N.; SATTTLER, A.; BAUERMANN, S. G. Análise polínica de mel de

abelha mandaçaia (*Melipona quadrifasciata quadrifasciata* Lepeletier) no Rio Grande do Sul, Brasil: monitoramento anual em duas localidades. **Acta Biológica Catarinense**, v. 9, n. 2, p. 89-111, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21726/abc.v9i2.1673>

RADER, R.; REILLY, J.; BARTOMEUS, I.; WINFREE, R. Native bees buffer the negative impact of climate warming on honeybee pollination of watermelon crops. **Global Change Biology**, v.19, n.10, p.3103-3110, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.12264>

RISSATO, S. R.; GALHIANE, M. S.; ALMEIDA, M. V.; GERENUTTI, M.; APON, B. M. Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry and application in environmental contamination. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p.1719-1726, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.034>

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **PLoS One**. v.10, n.12, p. e0146021. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>

RODRIGUES, C. D. S.; FERASSO, D. C.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R.; GRANDO, R. C.; TREICHEL, H.; COELHO, G. C.; MOSSI, A. J. Quality of Meliponinae honey: Pesticides residues, pollen identity, and microbiological profiles. **Environmental Quality Management**. v. 27, n. 4, p.39-45, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/tqem.21547>

RONDEAU, S.; RAINE, N. E. Fungicides and bees: a review of exposure and risk. **Environment International**, v. 165, p. 107311, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107311>

ROSELINO, A. C.; SANTOS, S. A. B.; BEGO, L. R. Qualidade dos frutos de pimentão (*Capsicum annuum* L.) a partir de flores polinizadas por abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier 1836 e *Melipona scutellaris* Latreille 1811) sob cultivo protegido. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 2, p. 154-158, 2010. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/index.php/rbrasbioci/article/view/114921>. Acesso em: 5 nov. 2023.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. **PLoS ONE**. v. 9, n. 4, p.e94482, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>

SANTOS, J. A.; BARRETO, L. M. R. C.; BELISARIO, D. L.; CHAMBÓ, E. D.; REBOUÇAS, J. S.; CALDAS, M. J. M.; CONCEIÇÃO, J. S.; FARIAS, É. O. S.; SANTOS, E. F.; CARVALHO, C. A. L. Toxicidade do glifosato em *Nannotrigona testaceicornis*. In: Editora Científica Digital (Org.). **Open science research IX**. Guarujá-SP: Científica Digital, 2022. p. 49-59. DOI: <https://doi.org/10.37885/221211325>

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides—uma visão geral.

Alimentos e Nutrição Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SANTOS, R. S.; CARNEIRO, L. T.; SANTOS, J. P. O.; SILVA, M. M.; MILFONT, M. O.; CASTRO, C. C. Bee pollination services and the enhancement of fruit yield associated with seed number in self-incompatible tangelos. **Scientia Horticulturae**, v. 276, p.109743, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109743>

SCHUHMANN, A; SCHMID, A. P.; MANZER, S.; SCHULTE, J.; SCHEINER, R. Interaction of insecticides and fungicides in bees. **Frontiers in Insect Science**, v. 1, p. 808335, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/finsc.2021.808335>

SEIDE, V. E.; BERNARDES, R. C.; PEREIRA, E. J. G.; LIMA, M. A. P. Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1854-1860, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.020>

SILVA, C. I.; PACHECO FILHO, A. J. S.; FREITAS, B. M. Polinizadores manejados no Brasil e sua disponibilidade para a agricultura. In: **Agricultura e Polinizadores**. Associação Brasileira de Estudos das Abelhas - A.B.E.L.H.A, São Paulo: 2015.

SILVA, G. R.; PÉREZ-MALUF, R.; RIBEIRO, G. S.; GUSMÃO, A. L. J. Pollination service of *Nannotrigona testaceicornis* stingless bees in strawberry. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, p.e0292019, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000292019>

SILVA-NETO, C. M.; RIBEIRO, A. C. C.; GOMES, F. L.; MELO, A. P. C.; OLIVEIRA, G. M.; FAQUINELLO, P.; FRANCESHINELLI, E. V.; NASCIMENTO, A. R. The stingless bee mandaçaia (*Melipona quadrifasciata* Lepeletier) increases the quality of greenhouse tomatoes. **Journal of Apicultural Research**, v. 58, n. 1, p. 9-15, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1494913>

SODERLUND, D. M. Neurotoxicology of pyrethroid insecticides. In: **Advances in Neurotoxicology**. Academic Press, v.4, p. 113-165. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2019.11.002>

SOUZA, R. R.; ABREU, V. H. R.; DE NOVAIS, J. S. Melissopalynology in Brazil: a map of pollen types and published productions between 2005 and 2017. **Palynology**, v. 43, n. 4, p. 690-700, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/01916122.2018.1542355>

SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O.; DIAS, C. S.; CLARTON, L. **Manduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrota**. Cruz das Almas, BA : Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. 2009. 46p. (Série Meliponicultura; 7).

THERNEAU, T. M.; GRAMBSCH, P. M. **Modeling Survival Data**: Extending the Cox Model. Springer, New York. 2000.

THOMPSON, H.; WILKINS, S. Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid/fungicide mixtures. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 131-134,

2003. Disponível em: <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol56-2003-131-134thompson.pdf>. Acesso em: 12 de dez. de 2023.

TOLEDO-HERNÁNDEZ, E.; PEÑA-CHORA, G.; HERNÁNDEZ-VELÁZQUEZ, V. M.; TORIBIO-JIMÉNEZ, J.; ROMERO-RAMÍREZ, Y.; LEÓN-RODRÍGUEZ, R. The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. **Apidologie**, v. 53, n. 8, p. 1-23, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00913-w>

TOMÉ, H. V. V.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A. P.; CAMPOS, L. A. O.; GUEDES, R. N. C. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38406, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038406>

TOMÉ, H. V. V.; BARBOSA, W. F.; MARTINS, G. F.; GUEDES, R. N. C. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, n. 1, p. 103–109, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.038>

TOMÉ, H. V. V.; RAMOS, G. S.; ARAÚJO, M. F.; SANTANA, W. C.; SANTOS, G. R.; GUEDES, R. N. C.; MACIEL, C. D.; NEWLAND, P. L.; OLIVEIRA, E. E. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 1, p.160866, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.160866>

TOSI, S.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. **Scientific Reports**, v. 7, n. 15132, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15308-6>

TOSI, S.; SFEIR, C.; CARNESECCHI, E.; VANENGELSDORP, D.; CHAUZAT, M. P. Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta-analysis and new risk assessment tools. **Science of the Total Environment**, v. 844, p. 156857, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156857>

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Guidance for Assessing Pesticide Risks to Bees**. Washington, D.C.: U.S. Environmental Protection Agency, 2014. 59p. Disponível em: https://www.epa.gov/sites/default/files/2014-06/documents/pollinator_risk_assessment_guidance_06_19_14.pdf. Acesso em: 14 de dez. 2023.

VIANA, B. F.; COUTINHO, J. G. E.; GARIBALDI, L. A.; CASTAGNINO, G. L. B.; GRAMACHO, K. P.; SILVA, F. O. Stingless bees further improve apple pollination and production. **Journal of Pollination Ecology**, v. 14, n. 25, p. 261-269, 2014. DOI: [https://doi.org/10.26786/1920-7603\(2014\)26](https://doi.org/10.26786/1920-7603(2014)26)

VIEIRA, A. S.; LOPES, Z. D. S.; SANTOS, J. B.; NUNES, L. A.; WALDSCHMIDT, A. M. Pollen spectrum collected by *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1863 (Apidae: Meliponini) in an anthropized region of Caatinga. **Grana**, v.61, n.3, p.225-234, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173134.2022.2037018>

WOLOWSKI, M.; AGOSTINI, K.; RECH, A. R.; VARASSIN, I. G.; MAUÉS, M.; FREITAS, L.; CARNEIRO, L. T.; BUENO, R. O.; CONSOLARO, H.; CARVALHEIRO, L.; SARAIVA, A. M.; SILVA, C, I. **Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil**. São Carlos, SP: Editora Cubo, 2019. 179p.

YERRAGUNTA, V.; SUMAN, D.; SWAMY, K.; ANUSHA, V.; PATIL, P.; NARESH, M. Pyrazole and its biological activity. **PharmaTutor**, v. 2, n. 1, p. 40-48, 2014.

ZARN, J. A.; BRÜSCHWEILER, B. J.; SCHLATTER, J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 α -demethylase and aromatase. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 3, p. 255-261, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1289/ehp.5785>

ZHU, B.; LIU, L.; GONG, Y.X.; LING, F.; WANG, G.X. Triazole-induced toxicity in developing rare minnow (*Gobiocypris rarus*) embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 23, p. 13625-13635, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3317-6>

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro estudo que avaliou a toxicidade do Lambda-Cialotrina, Triflumizol e Fenpiroximato em *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Os resultados obtidos, contribuem para a compreensão dos impactos desses agrotóxicos na saúde das abelhas nativas, destacando a importância de novos estudos que se aprofundem nos efeitos subletais causados por esses compostos. As alterações comportamentais observadas nas três vias de exposição dos três ingredientes ativos apontam para novas linhas de investigação, pois podem ser determinantes para a sobrevivência ou para o pleno desenvolvimento das colônias de *M. q. anthidioides*. Neste sentido, novas pesquisas precisam ser realizadas, a fim de analisar as alterações metabólicas provocadas pela exposição das abelhas aos i.a., de modo que se possa entender mais profundamente a ação destes produtos no organismo das abelhas. Investigar os mecanismos específicos pelos quais diferentes pesticidas influenciam a capacidade de desintoxicação das abelhas pode fornecer informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias de manejo que minimizem os impactos adversos na saúde desses polinizadores.