



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

REBECA NATAL ZAGO

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS DE OPERÁRIAS CAMPEIRAS DA ESPÉCIE *Scaptotrigona depilis* (APIDAE, MELIPONINI) EXPOSTAS AO GERANIOL E NANOGERANIOL

Londrina – Paraná
2025

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

REBECA NATAL ZAGO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS
DE OPERÁRIAS CAMPEIRAS DA ESPÉCIE
Scaptotrigona depilis (APIDAE, MELIPONINI)
EXPOSTAS AO GERANIOL E NANOGERANIOL**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia
Coorientadora: Me. Isabela Toninato Tavares**

**Londrina – Paraná
2025**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Zago, Rebeca Natal. AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS DE OPERÁRIAS CAMPEIRAS DA ESPÉCIE *Scaptotrigona depilis* (APIDAE, MELIPONINI) EXPOSTAS AO GERANIOL E NANOGERANIOL / Rebeca Natal Zago. - Londrina, 2025. 35 f. : il.

Orientador: Silvia Helena Sofia. Coorientador: Isabela Toninato Tavares. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2025. Inclui bibliografia.

1. Abelhas-sem-ferrão - TCC. 2. Acetilcolinesterase - TCC. 3. Nanotecnologia - TCC. I. Sofia, Silvia Helena. II. Tavares, Isabela Toninato. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia

Me. Isabela Toninato Tavares

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina, 09 de dezembro de 2025

DEDICATÓRIA

À minha família, pelo apoio absoluto que, durante toda a minha vida, transformou meus sonhos em realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Silvia Helena Sofia, pelo acolhimento, orientação e cuidado durante todo o meu trabalho.

À Me. Isabela Toninato Tavares, que fez muito além do seu papel de coorientadora: foi amiga. Agradeço por cada ensinamento. Que seu futuro seja tão brilhante quanto você!

À Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, por aceitar o convite para compor minha banca examinadora e pelo apoio durante o desenvolvimento desse projeto.

Aos membros do Laboratório de Genética e Ecologia Animal, que sempre tornam meus dias mais leves e divertidos, agradeço o apoio e o cuidado.

Aos membros do Laboratório de Ecofisiologia Animal, que me receberam de braços abertos e ajudaram sempre que precisei. Agradeço pelo apoio, pelo carinho e pelas risadas.

À minha família, Renata, Ricardo, Raquel, José e Antônia, que me proporcionaram o apoio necessário para completar essa etapa, assim como fizeram durante toda a minha vida. Sem vocês eu não seria metade da mulher que sou.

Ao meu companheiro, Giovanni, que me acompanhou no último ano da graduação, segurou minha mão quando tudo parecia difícil demais e sempre me confortou nos momentos de insegurança.

Às minhas melhores amigas: Ana Livia, Eloisa, Julia e Milena, com quem compartilhei os meus dias ao longo da graduação. Sem o apoio de vocês, eu não estaria onde estou. Vocês são, agora, parte de mim e espero levá-las por uma vida inteira.

À Marta Merissi, que se tornou minha família longe de casa. Obrigada por todos os esforços que fez pelo meu conforto e felicidade.

Aos demais amigos que fiz durante os anos de graduação, que tornaram essa etapa uma das mais maravilhosas de ser vivida.

À Deus, por me abençoar com pessoas boas e forças para trilhar meu caminho.

Ao NAPI Abelhas e Fundação Araucária, pelo apoio financeiro para desenvolvimento do projeto.

ZAGO, Rebeca Natal. **Avaliação de biomarcadores bioquímicos de operárias campeiras da espécie *Scaptotrigona depilis* (Apidae, Meliponini) expostas ao geraniol e nanogeraniol.** 2025. 35 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2025.

RESUMO

As abelhas-sem-ferrão (Apidae, Meliponini) são polinizadoras essenciais nos ecossistemas naturais e agrícolas. Como outros grupos de abelhas, suas populações estão sob inúmeras ameaças antrópicas. Dentre as principais delas, estão os pesticidas químicos sintéticos. Na agricultura, novas alternativas sustentáveis surgem, como os biopesticidas naturais e formulações nanoencapsuladas, buscando otimizar seu sistema de entrega. O presente estudo avaliou os efeitos do geraniol (GER) e do nanogeraniol (NANO) sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) em operárias campeiras da abelha-sem-ferrão *Scaptotrigona depilis*, através da análise de tecidos da cabeça e tórax. As abelhas coletadas foram submetidas, oralmente, a doses subletais dos contaminantes, e os possíveis efeitos na atividade da AChE nos grupos expostos ao geraniol ou nanogeraniol foram mensurados por meio de espectrometria após os intervalos de 24 h e 72 h. Os resultados revelaram um efeito tóxico inicial no tórax, com inibição significativa da AChE em ambos os grupos. No entanto, após 72 h, o grupo do composto nanoencapsulado exibiu uma reversão notável, com atividade enzimática significativamente superior à dos demais. Esse padrão sugere uma recuperação ou supercompensação enzimática, indicando a viabilidade da ativação de um mecanismo adaptativo. Conclui-se que a formulação nanoencapsulada, ao permitir uma entrega gradual do princípio ativo, mostrou-se menos impactante a médio prazo, permitindo a recuperação fisiológica das abelhas. Dessa forma, os biopesticidas combinados com a nanotecnologia trazem um duplo benefício para as culturas agrícolas: mantêm o potencial de controle de pragas enquanto reduzem os impactos sobre polinizadores essenciais, representando uma ferramenta promissora para agricultura sustentável.

Palavras-chave: Abelhas-sem-ferrão. Ecotoxicologia. Acetilcolinesterase. Nanotecnologia.

ZAGO, Rebeca Natal. **Assessment of biochemical biomarkers in forager bees *Scaptotrigona depilis* (Apidae, Meliponini) exposed to geraniol and nanogeraniol.** 2025. 35 pgs. Final Dissertation (Biological Sciences Undergraduation) – Londrina State University. Londrina. 2025.

ABSTRACT

Stingless bees (Apidae, Meliponini) are essential pollinators in natural and agricultural ecosystems. Like other bee groups, their populations face numerous anthropogenic threats. Among the main threats are synthetic chemical pesticides. In agriculture, new sustainable alternatives are emerging, such as natural biopesticides and nanoencapsulated formulations, aiming to optimize their delivery system. This study evaluated the effects of geraniol (GER) and nanogeraniol (NANO) on the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in forager workers of the stingless bee *Scaptotrigona depilis*, through the analysis of head and thorax tissues. The collected bees were orally administered sublethal doses of the contaminants, and the potential effects on AChE activity in groups exposed to geraniol or nanogeraniol were measured using spectrometry after intervals of 24 h and 72 h. The results revealed an initial toxic effect in the thorax, with significant inhibition of AChE in both groups. However, after 72 h, the nanoencapsulated compound group exhibited a notable reversal, with enzymatic activity significantly higher than the others. This pattern suggests enzymatic recovery or supercompensation, indicating the feasibility of activating an adaptive mechanism. It is concluded that the nanoencapsulated formulation, by allowing a gradual release of the active ingredient, proved to be less impactful in the medium term, enabling the physiological recovery of the bees. Thus, biopesticides combined with nanotechnology offer a dual benefit for agricultural crops: they maintain pest control potential while reducing impacts on essential pollinators, representing a promising tool for sustainable agriculture.

Keywords: Stingless bees. Ecotoxicology. Acetylcholinesterase. Nanotechnology.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 As abelhas-sem-ferrão	3
2.2 A polinização	3
2.3 A Revolução Verde	4
2.4 Uso de agrotóxicos em culturas brasileiras	4
2.5 O distúrbio do colapso das colônias (CDC).....	5
2.6 Neurotransmissão em abelhas	6
2.7 Biomarcadores bioquímicos	7
2.8 O surgimento e a ascensão dos biopesticidas	8
2.9 Nanotecnologia	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Modelo Biológico	9
3.2 Síntese de nanopartículas	10
3.3 Local e método de coleta	11
3.4 Delineamento experimental.....	13
3.5 Análise bioquímica	15
3.6 Análise estatística	16
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	17
6. CONCLUSÕES	20
REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

Com cerca de 20.900 espécies catalogadas atualmente (Ascher e Pickering, 2024), as abelhas desempenham um processo fundamental para a saúde e manutenção dos ecossistemas: a polinização. As abelhas dependem de produtos das angiospermas para sua alimentação e durante suas atividades de forrageio desempenham o trabalho de polinizar (Pollinators Fact Sheet, 2012). Esse trabalho permite às plantas com flores, também conhecidas como angiospermas, a capacidade de transferir suas células reprodutivas entre outras plantas da mesma espécie. Em regiões tropicais, como é o caso do Brasil, cerca de 94% das plantas são polinizadas por animais (Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011).

Ainda segundo Potts et al. (2016), esses insetos polinizadores estão ligados ao bem-estar não apenas dos ecossistemas, mas também da vida humana, pois são importantes para as produções agrícolas que garantem a segurança alimentar. De acordo com McGregor (1976), levando em consideração o consumo total de alimentos de origem animal e vegetal pela população mundial, cerca de 1/3 da dieta humana é dependente do processo de polinização. Além disso, esse processo está também ligado à qualidade e a eficiência das plantações.

Mesmo que a polinização seja essencial para manutenção da biodiversidade e da vida humana, Potts et al. (2010) evidencia um declínio no número de polinizadores e, conseqüentemente, na diversidade das plantas que dependem desse serviço. Além do impacto ambiental, segundo Smith et al. (2015), a perda dos

polinizadores pode resultar no aumento de quadros de deficiência de vitamina A e anemia, além do aumento de mortes por doenças relacionadas à má nutrição.

Dentre os principais motivos para o declínio das abelhas em todo o mundo, podemos citar diversas atividades antrópicas, a perda de habitats naturais para conversão da terra em áreas agrícolas, e o uso intensivo de pesticidas na agricultura, que pode levar à contaminação de uma das principais fontes de alimentos das abelhas: o pólen. Ao contrário das abelhas melíferas, que ingerem pólen processado, as abelhas-sem-ferrão têm uma dieta fundamentada em pólen em seu estado menos processado, elevando sua vulnerabilidade à contaminação. Esse fator é agravado pela sua estratégia de nidificação, que frequentemente ocorre no solo ou envolve a coleta de materiais terrosos para a construção dos ninhos, estabelecendo uma via de contaminação direta (Cham et al., 2019).

Nesse contexto, passaram a ser investigados os biopesticidas de origem natural, como o geraniol, oriundo de óleos essenciais, e a estratégia de seu nanoencapsulamento, buscando otimizar as aplicações. Os compostos nanoencapsulados possuem um processo de entrega mais eficaz, diminuindo o número de aplicações, o efeito sobre organismos não-alvo e podem ser biodegradáveis (Kah, 2018), sendo considerados uma alternativa sustentável para o uso dos defensivos biológicos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do geraniol — em sua forma livre e nanoencapsulada — sobre abelhas *Scaptotrigona depilis* Moure, 1942. Para isso, foi realizado um bioensaio que utilizou a atividade da enzima acetilcolinesterase como biomarcador de toxicidade deste composto nos organismos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 As abelhas-sem-ferrão

As abelhas-sem-ferrão fazem parte da tribo Meliponini, considerado o maior e mais diverso grupo de abelhas que possuem corbícula, uma estrutura côncava no último par de pernas utilizada para armazenamento de pólen e demais produtos coletados em campo. Esses meliponíneos vivem, majoritariamente em regiões tropicais e subtropicais do planeta (Grüter, 2020). De acordo com Menezes et al. (2023), as abelhas-sem-ferrão se destacam por conta de seu ferrão não funcional e aspectos relacionados aos seus ninhos, como os lugares que escolhem para nidificação, tendo preferências por cavidades preexistentes.

Nas áreas onde vivem, as abelhas-sem-ferrão proporcionam, além da produção do mel, a polinização das espécies nativas, como é o caso da maioria das espécies de árvores das florestas tropicais, que dependem da polinização destes animais (Michener, 2007).

2.2 A polinização

A polinização é um tipo de relação mutualística. As plantas com flores disponibilizam diversos recursos que podem beneficiar animais polinizadores: alimento (néctar e pólen), materiais para construção de ninhos (resina) e fragrâncias que podem atrair mais parceiros. Enquanto isso, os polinizadores também trazem benefícios para as plantas: ao visitar as flores, ficam carregados de grãos de pólen, os gametas masculinos, e os dispersam para as estruturas femininas. Desse modo, garantem a autofecundação, quando o grão de pólen é carregado para a estrutura feminina da mesma planta, e a fecundação cruzada, quando o grão de pólen é

carregado para outra planta da mesma espécie (Rech et al., 2014).

Além do importante trabalho polinizando espécies nativas, as abelhas também são importantes para as culturas brasileiras, influenciando a qualidade e a produtividade das mesmas. A polinização também garante a variabilidade genética das espécies, auxiliando sua perpetuação (Caetano et al., 2024).

2.3 A Revolução Verde

Com o aumento da população mundial e, conseqüentemente, a demanda por alimentos, foi necessário o desenvolvimento de mecanismos que garantissem plantações mais rentáveis, buscando atender novas necessidades e garantir a segurança alimentar de toda a população, cenário que recebeu o nome de “Revolução Verde” (Hamdan et al., 2022).

Dentre as inovações trazidas por essa revolução, é possível citar técnicas para melhora da irrigação, automação dos processos e o desenvolvimento e a introdução de agrotóxicos nas plantações, processos que possibilitaram as produções agrícolas ultrapassarem, em crescimento, a população mundial. Apesar de ser responsável pela segurança alimentar de bilhões de pessoas, a revolução trouxe inúmeros impactos ambientais, com a contaminação da biodiversidade pelo uso intensivo de agrotóxicos (Ameen, 2018).

2.4 Uso de agrotóxicos em culturas brasileiras

Nos anos de 2007 a 2016, os agrotóxicos ocuparam o segundo lugar dentre os maiores responsáveis pelos casos de intoxicação no Brasil, representando 16% das ocorrências totais, o que equivaleu à 26 pessoas contaminadas por dia durante esse período. Os agrotóxicos agrícolas são apontados como os maiores agentes definidores desses números (De Lara et al., 2019).

Durante os últimos doze anos, foi possível observar um aumento no uso de agrotóxicos nas produções agrícolas (Gaboardi; Candiotto; Panis, 2023). É possível identificar que o governo brasileiro, em acordo com os interesses do agronegócio, tem afrouxado as normas que regem a produção e o uso desses compostos nas monoculturas. Dentre os agrotóxicos mais utilizados no nosso país, alguns deles são banidos por países que possuem rígida legislação, pois apresentam um risco para insetos polinizadores (Gaboardi; Candiotto; Panis, 2023).

2.5 O distúrbio do colapso das colônias (CDC)

O termo “distúrbio do colapso das colônias” surgiu nos Estados Unidos, após um declínio em massa de colônias de abelhas entre o inverno e primavera de 2006 e 2007. Os principais sintomas de colônias afetadas por esse distúrbio são: ausência de abelhas adultas nos ninhos, seguida por pouca ou nenhuma evidência de morte das mesmas, além de crias abandonadas, ainda com alimento guardado. As causas ainda são discutidas, mas entre elas, os termos “contaminação química” e “agrotóxicos” se repetem. O uso impróprio desses contaminantes são o principal fator que ameaça os polinizadores atualmente e, no caso das abelhas, evidências mostram que a contaminação parte dos alimentos, como o néctar e o pólen, posteriormente sendo carregados até as colônias, causando um colapso em toda a sua estrutura (Kluser e Peduzzi, 2007).

No Brasil, relatos de enfraquecimento ou perda de colônias também tem se tornado mais frequentes e, através da análise de dados obtidos em pesquisas desenvolvidas sobre as ameaças à saúde das abelhas, podemos concluir que esse fenômeno é uma resposta a uma causa previamente conhecida: a intoxicação (Pires et al., 2016).

2.6 Neurotransmissão em abelhas

O modo de vida das abelhas é baseado em sua memória e seu olfato. As memórias associativas das abelhas são formadas a partir da ligação entre as atividades de forrageio e uma boa experiência, que surgem como uma espécie de recompensa. É assim que as abelhas escolhem sua fonte de alimento, mantendo uma constância de flores a serem visitadas. Esses sentidos, indispensáveis para sua sobrevivência, estão ligados ao sistema nervoso desses insetos, e diversas pesquisas buscam analisar os impactos de contaminantes sob suas funções motoras (Paoli e Giurfa, 2024).

O sistema colinérgico, sistema de neurotransmissores que utiliza a acetilcolina como principal neurotransmissor, é essencial para garantir a sobrevivência dos insetos, já que os sentidos estão ligados às transmissões e impulsos transmitidos por ele. Isso acontece, pois, a acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório no sistema nervoso dos insetos, responsável por induzir os estímulos nervosos entre os neurônios através das sinapses colinérgicas, replicando a mensagem de um para o outro. Os receptores colinérgicos desses animais estão ligados à memória e ao olfato, previamente apresentados como capacidades essenciais para o sucesso do forrageamento (Grünewald e Siefert, 2019).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima inibidora da acetilcolina, atuando através da hidrólise da ACh, quebrando-a em colina e ácido acético. Após essa quebra, a colina liberada (Ch) é reutilizada na formação de mais ACh (Figura 1) (Petronilho e Figueiroa-Villar, 2024).

Essa quebra da acetilcolina resulta na interrupção dos estímulos nos neurônios, cessando a transmissão do sinal através das sinapses. Os organofosforados e os carbamatos representam uma classe de inseticidas que agem

na inibição da AChE, se ligando ao sítio ativo da enzima e impedindo que ela bloqueie a produção de acetilcolina. Esta inibição faz com ocorra o acúmulo de Ach nos tecidos, produzindo impulsos nervosos contínuos, podendo afetar o comportamento dos animais contaminados e causar contrações prolongadas nos músculos, resultando em sobrecarga do sistema nervoso, paralisias e até morte (Umar e Aisami, 2020).

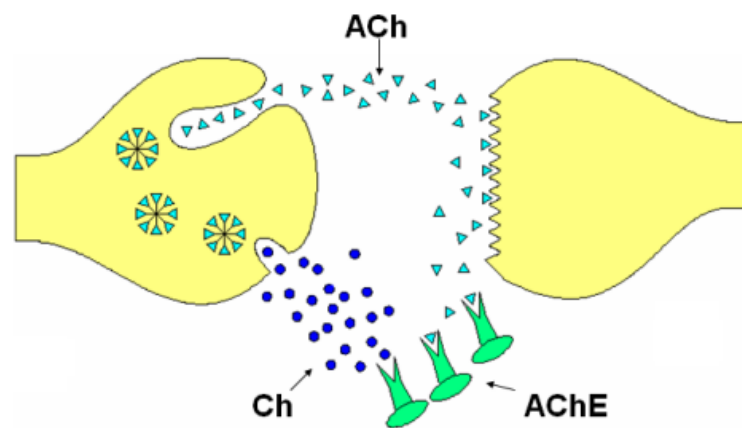


Figura 1. Transmissão neuronal e hidrólise da acetilcolina (ACh) pela acetilcolinesterase (AChE), resultando na liberação de colina (Ch).

Fonte: Petronilho e Figueiroa-Villar, 2014

Há, ainda, outra classe de inseticidas amplamente comercializados que também afetam o sistema colinérgico dos insetos: os neonicotinoides, originados da nitiazena. Mimetizando a acetilcolina, são responsáveis por se ligar aos seus receptores nicotínicos (nAChR) e ativá-los, inibindo a ação da acetilcolinesterase, resultando em outro tipo de superestimulação descontrolada, que pode se manifestar em tremores e paralisias, até levar o inseto à morte (Ihara e Matsuda, 2018).

2.7 Biomarcadores bioquímicos

Os biomarcadores são respostas biológicas mensuráveis à químicos ambientais, podendo ser medido à níveis individuais (alterações no organismo) ou

abaixo deles (alterações moleculares). Podem ser respostas bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas ou comportamentais (Walker et al., 2005).

Quando tratamos de toxicologia ambiental, há a necessidade de se utilizar biomarcadores precisos, que podem ser reproduzidos em ambiente controlado, para avaliar efeitos fisiológicos causados por contaminantes. Os organofosfatos, carbamatos e neonicotinoides agem diretamente no sistema colinérgico, responsável por manter a transmissão de informações por todo o sistema nervoso, mantendo seu bom funcionamento. Tendo em vista a importância das enzimas acetilcolina e acetilcolinesterase, e o modo de ação dos contaminantes citados, a análise de atividade da AChE é considerada um biomarcador relevante para estudos da contaminação por essa classe de pesticidas (Nunes, 2014).

2.8 O surgimento e a ascensão dos biopesticidas

Os biopesticidas apresentam uma alternativa sustentável e mais segura em relação aos pesticidas químico sintéticos, uma vez que utilizam de produtos naturais em sua composição. São compostos eficientes em menores quantidades, de rápida decomposição, com menor toxicidade, sendo menos danosos aos organismos não-alvos (Andrade et al., 2019). O aumento na sua utilização está previsto para crescer, anualmente, cerca de 15%, sendo esperado que nos anos 2050, já tenham ultrapassado o mercado dos compostos sintéticos (Damalas e Koutoubas, 2018).

Os extratos de plantas têm sido testados como possíveis componentes no desenvolvimento de biopesticidas, como é o caso dos óleos essenciais, que, além da sua natureza volátil, responsável pela sua configuração como substâncias facilmente degradáveis, apresentam ações eficazes contra pragas e patógenos que podem afetar as plantações (Koul; Walia; Dhaliwal, 2008).

Os óleos essenciais são compostos naturais aromatizados, como é o

caso do geraniol, um composto orgânico, com uma estrutura monoterpeneo contendo um grupo álcool (Figura 2), encontrado em diversas flores, possuindo um aroma agradável. Além de ser utilizado amplamente em fragrâncias, possui propriedades inseticidas, antifúngicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Devido à essas configurações, é considerado um óleo essencial propício para atuar como biopesticida (De Lira et al., 2020).

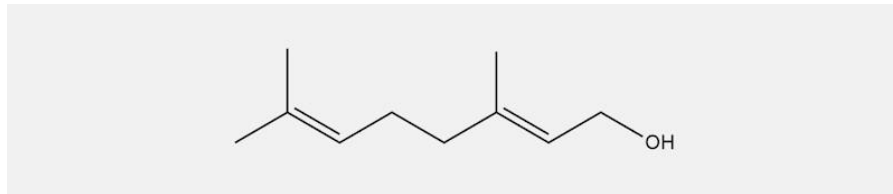


Figura 2. Estrutura química do geraniol
Fonte: Lei et al., 2019

2.9 Nanotecnologia

A nanotecnologia se refere ao encapsulamento de substâncias em escala nanométrica, utilizando polímeros ou dendrímeros, a fim de otimizar o mecanismo de entrega e eficiência de algum composto. Essa técnica permite menos aplicações, e, conseqüentemente, menor toxicidade, sendo considerada uma ótima alternativa quando se trata de aplicações de biopesticidas em áreas agrícolas, diminuindo a chance de contaminação de organismos não-alvos (Ditta, 2016).

Por conta de sua natureza instável e suscetibilidade à degradação, é ideal que os óleos essenciais passem por um processo de encapsulamento para melhora da sua performance (Bakry et al., 2016).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo Biológico

A espécie de abelhas-sem-ferrão *Scaptotrigona depilis* Moure, 1942 (Figura 3), pertence à tribo Meliponini, que possui cerca de 550 espécies catalogadas (Grüter, 2020). Essa espécie é encontrada no Sul e Sudeste do Brasil, pode chegar a medir 5,5 mm e representa grande importância para a meliponicultura brasileira. Seu hábito de nidificação são ocos de árvores e os ninhos atingem a população média de 10.000 abelhas operárias, além de uma rainha (Menezes et al., 2023).

A espécie foi utilizada como exemplar neste trabalho pois, segundo o Catálogo Moure de Espécies Neotropicais, pode ser encontrada nos estados de Mato Grosso do Sul, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, São Paulo, Tocantins e Santa Catarina, onde, de acordo com o IBGE, estão concentradas as maiores produções agrícolas do Brasil, o que aumenta a chance de contato dessa espécie com plantas contaminadas (Rosa et al., 2015).



Figura 3. *Scaptotrigona depilis*
Fonte: Nascimento et al., 2022

3.2 Síntese de nanopartículas

As nanopartículas utilizadas neste trabalho foram sintetizadas em laboratório localizado na UNESP, campus de Sorocaba, seguindo a metodologia de Hu e McClements (2014), modificada por Rogerio et al. (2022). Foram produzidas

através de emulsões com nanocápsulas de zeína preenchidas com geraniol, a uma concentração de 20 mg. mL⁻¹, com o tensoativo Pluronic F-68 como meio de diluição, na concentração de 2%. Além disso, emulsões de apenas geraniol e apenas nanocápsulas de zeína, sem conteúdo em seu interior, também foram produzidas, na mesma concentração de 20 mg. mL⁻¹ (Tavares, 2025).

A zeína é a proteína de reserva do milho, e é citada como um bom material para encapsulamento por suas inúmeras propriedades (Kasaai, 2018), enquanto o pluronic é um polímero frequentemente utilizado na formulação de nanocompostos devido à sua alta comercialidade e baixo custo (Khaliq et al., 2023).

3.3 Local e método de coleta

Os exemplares de abelhas *Scaptotrigona depilis* utilizadas nos experimentos foram coletadas de cinco colônias diferentes e independentes (Figura 4), alocadas no Meliponário Didático da Universidade Estadual de Londrina, localizado a cerca de 150m de onde os bioensaios aconteceram. Durante todo o período de experimento, semanalmente, cada uma das colônias recebeu uma mistura de água e mel de *Apis mellifera* (1:1, v/v) em alimentador artificial, a fim de oferecer suplementação alimentar, buscando manter a estabilidade das mesmas. Cada uma das colônias foi identificada com diferentes letras: A, B, C, D e E.



Figura 4. Colônia de *Scaptotrigona depilis* alocada no Meliponário Didático
Fonte: a própria autora, 2025

Todas as coletas aconteceram no período da manhã e, de acordo com testes preliminares, foi mantido um intervalo de trinta minutos entre elas, garantindo, assim, tempo suficiente para a execução do trabalho necessário em cada um dos tratamentos. Segundo adaptações feitas na metodologia de Botina et al. (2020), os indivíduos foram coletados em frascos transparentes de 500mL (Figura 5), com o fundo forrado por um disco de papel filtro e pequenas aberturas na tampa, permitindo a respiração dos indivíduos e a introdução do alimentador, um microtubo plástico de 1,5mL com perfurações.



Figura 5. Abelhas em recipiente plástico com alimentador
Fonte: a própria autora, 2025.

As abelhas operárias foram capturadas na entrada do ninho, enquanto saíam para suas coletas em campo, e logo após foram levadas, em um recipiente escuro, até ao Laboratório de Genética e Ecologia Animal.

Foram, então, mantidas dentro dos frascos utilizados para captura, no escuro, dentro de uma estufa de demanda bioquímica (BOD), a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 70%, buscando simular as condições naturais das colônias (Silva et al., 2016).

3.4 Delineamento experimental

De acordo com a metodologia adaptada por Tavares (2025), durante o experimento, a alimentação padrão das abelhas foi constituída por uma mistura de mel de *Apis mellifera* e água (1:1). Essa mistura foi oferecida aos indivíduos através de microtubo plástico de 1,5mL, alocado em um orifício na tampa dos recipientes. A partir das emulsões produzidas, soluções foram preparadas na concentração de 5 mg L^{-1} , decisão baseada em uma padronização de testes conduzidos em outros

organismos (Santos, 2024). As soluções foram preparadas com a diluição de cada uma das emulsões nas misturas de mel e água.

As abelhas passaram por cinco tratamentos alimentares ao longo dos experimentos: 1) Controle (CTR), contendo apenas a mistura padrão de mel e água; 2) Pluronic (PLU), solução contendo Pluronic F-68[®] na concentração de 0,0005%; 3) Zeína (ZEI), solução contendo nanopartículas vazias de zeína; 4) Geraniol (GER), solução contendo o geraniol livre; 5) Nanogeraniol (NANO), contendo o geraniol nanoencapsulado.

A fim de padronizar a alimentação dos indivíduos e incentivar a busca pelo alimento, antes do início dos testes, as abelhas ficaram sem acesso ao alimento pelo período de uma hora (Botina et al., 2020). Completa a primeira hora, a exposição oral foi iniciada, de acordo com os protocolos descritos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE 213, 1998).

Para cada tratamento, as abelhas receberam a solução de alimento tratado, por um período de 6 horas. Após esse período, foram alimentadas, por 18h, com o alimento padrão. Essa metodologia foi repetida até que se encerrassem os tempos experimentais, de 24 h e 72 h (Figura 6).

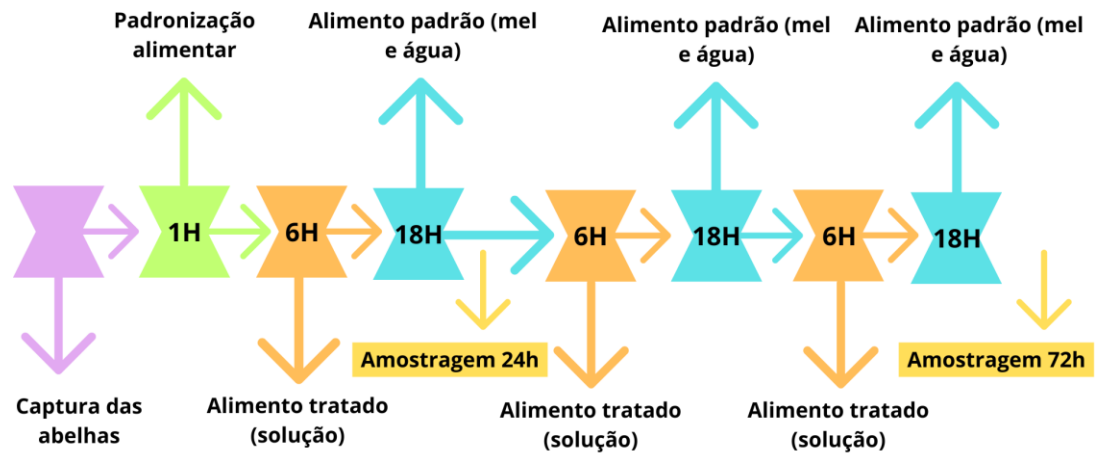


Figura 6. Esquematização da exposição oral

Fonte: modificado de Tavares, 2025

Cada um dos tratamentos (CTR, PLU, ZEI, GER e NANO) foi repetido cinco vezes, resultando em 25 amostras dos tratamentos em cada tempo experimental. Dentro dos recipientes, foram coletas, em média, 15 abelhas, totalizando 375 indivíduos capturados.

Durante o tempo experimental de 24 h, o tratamento NANO foi repetido apenas quatro vezes, devido à problemas relacionados com uma das coletas durante este período.

3.5 Análise bioquímica

Após o término do período de exposição, as abelhas foram anestesiadas em gelo e eutanasiadas através de decapitação. Para as análises bioquímicas, a cabeça e o tórax foram os tecidos escolhidos, sendo retirados de um tamanho amostral de 10 abelhas. Posteriormente, foram pesados, homogeneizados em homogeneizador mecânico com adição de Tampão Fosfato de Potássio 0,1 M, e centrifugados por 20 min, à 4°C e 13000 rpm, em seguida o sobrenadante foi retirado

e utilizado para análise da atividade da AChE, através da reação de DTNB e Iodeto de Acetilcolina em microplaca. Esta origina um composto de cor amarelada, que, logo após foi lido em espectrofotômetro, seguindo uma adaptação na metodologia de Elmann et al. (1961). Além disso, a quantificação de proteínas nos tecidos também foi analisada, segundo Bradford (1976).

3.6 Análise estatística

As análises foram realizadas através de planilhas Excel e do software GraphPad Prism (versão 10.1.2). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados. Em seguida, foi aplicado o teste de análise de variância paramétrica (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Tukey para as múltiplas comparações entre os grupos. Foram considerados valores significativos quando $p < 0,05$. Todos os gráficos apresentados foram produzidos a partir do GraphPad Prism.

4. RESULTADOS

Na análise de variância (ANOVA), houve uma ausência de diferenças significativas na atividade de acetilcolinesterase no tecido da cabeça das abelhas nos tempos de 24 h ($p = 0,0920$) e 72 h ($p = 0,3328$) (Figura 7). Em contraste, a atividade no tecido do tórax apresentou um perfil distinto: foram observadas diferenças significativas em 24 h ($p = 0,0016$) e em 72 h ($p = 0,0096$) (Figura 8). O teste de múltiplas comparações mostrou que, no tempo experimental de 24 h, a atividade da acetilcolinesterase foi significativamente reduzida nos tratamentos GER ($p = 0,0493$) e NANO ($p = 0,0006$) em comparação com o tratamento PLU. Enquanto isso, no período de 72 h, o perfil se alterou, e o tratamento NANO passou a exibir uma atividade enzimática significativamente superior à dos tratamentos ZEI ($p = 0,0166$) e GER ($p = 0,0124$).

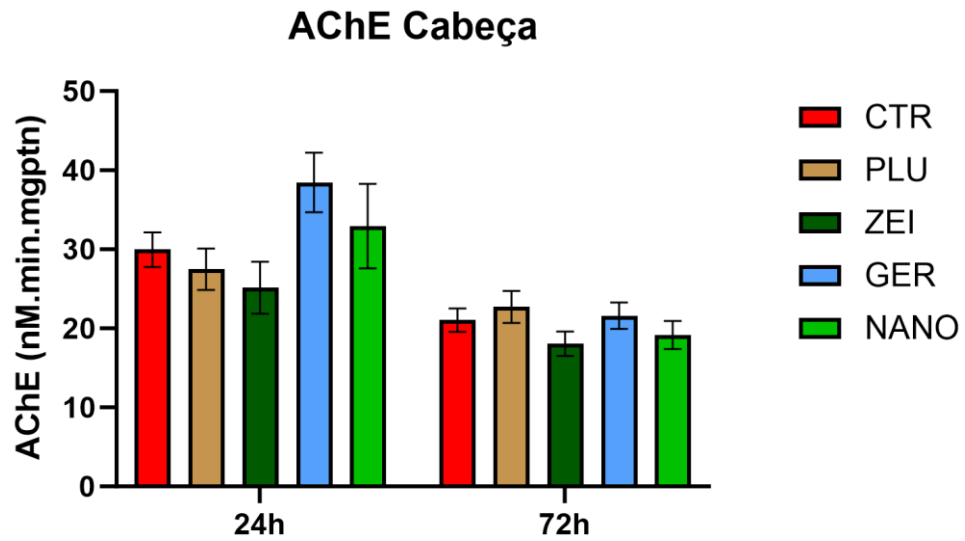


Figura 7. Gráfico de atividade da acetilcolinesterase (AChE) na cabeça de abelhas *Scaptotrigona delipilis*
Fonte: a própria autora, 2025

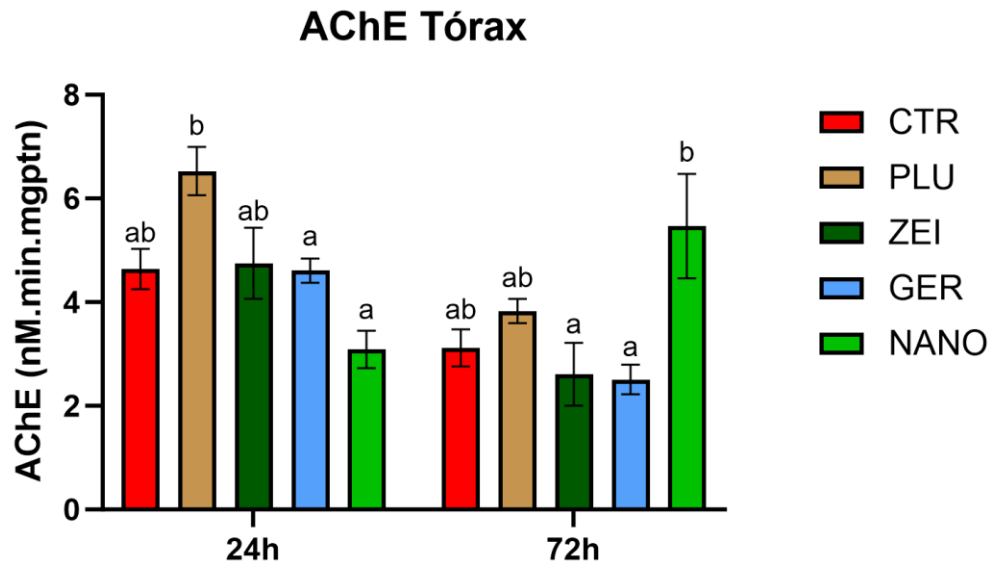


Figura 8. Gráfico de atividade da acetilcolinesterase (AChE) no tórax de abelhas *Scaptotrigona delipilis*.
 Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos.
Fonte: a própria autora, 2025

5. DISCUSSÃO

O perfil de contaminação identificado neste estudo - alterações significativas no tórax e ausentes na cabeça - direciona a hipótese para um efeito tóxico prioritário sobre a musculatura das abelhas. Esses dados encontram suporte na literatura, como no estudo de Williamson (2023), que, a partir de análises

comportamentais, foi capaz de associar a exposição a inibidores da AChE a uma diminuição da capacidade de voo. Essa evidência sugere que o mecanismo de ação envolve não somente o sistema nervoso central, mas também o periférico, prejudicando diretamente as funções musculares. Dados consistentes com a mudança nos padrões comportamentais locomotores das abelhas também foram encontrados em Colin et al. (2014) e Ayoub et al. (2024).

A falta de diferenças significativas associadas à cabeça também é consistente com descobertas recentes. Por exemplo, nos resultados apresentados por Wang (2023), De Souza et al. (2024) e Gauthier et al. (2018), em análises de atividade da AChE utilizando Tiametoxam, um neonicotinoide, em espécies distintas de abelhas, não foram detectadas diferenças significativas nos grupos tratados em comparação ao controle, reforçando que esse padrão de resposta pode ser comum a diferentes compostos e espécies.

Em Decio et al. (2021), a atividade da AChE em tecidos da cabeça apresentou diferenças estatisticamente significantes em apenas dois de cinco tempos experimentais. O aumento observado na atividade da enzima pode estar ligado à uma supercompensação ocasionada pela contaminação por neonicotinoides. Com os receptores nicotínicos preenchidos, a acetilcolinesterase não consegue agir por não reconhecer o inseticida ligado e aumenta sua atividade buscando interromper o impulso gerado.

Os dois conjuntos de evidências se complementam: enquanto os danos morfológicos e comportamentais são mais evidentes no tórax (musculatura), indicando o local de maior prejuízo funcional, as respostas bioquímicas na cabeça são tênues e compensatórias, explicando por que alterações no cérebro nem sempre são detectadas.

A ausência de efeitos significativos na cabeça dos insetos pode ser atribuída à sua morfologia. O sistema nervoso desses animais apresenta cordões nervosos centrais e gânglios nervosos (Brusca; Moore; Shuster, 2016). Seus neurônios, encontrados nos gânglios, são revestidos por uma camada de células da glia. Uma estrutura especializada desse revestimento, o perineuro, forma uma barreira hemolinfática, ou “sangue-cérebro”, seletiva. Essa barreira é essencial para regular a composição química e iônica do ambiente neural, uma vez que a hemolinfa sofre variações significativas (Chapman, 2013).

Dessa forma, é plausível que essa proteção tenha reduzido a difusão dos contaminantes presentes na dieta até o tecido neural, explicando a falta de alteração significativa na atividade da acetilcolinesterase (AChE) observada na cabeça das abelhas no presente estudo.

O aumento da atividade da AChE no tórax no tratamento NANO no segundo tempo experimental (72 h), em comparação com o primeiro (24 h), pode ser um mecanismo adaptativo de resposta ao estresse. Essa hipótese encontra suporte no trabalho de Williamson (2013), conduzido com abelhas melíferas. Em seu estudo, ao serem expostas a um inibidor de AChE, as abelhas *A. mellifera* exibiram uma notável adaptação fisiológica: um aumento na expressão do gene AChE-2, codificador da enzima acetilcolinesterase, em ambos os tecidos analisados, cérebro e abdômen. Segundo o autor, esse fenômeno, associado à diminuição da expressão do gene AChE-1, o principal alvo dos compostos citado ao longo do estudo, configura um mecanismo de contra-ataque que permite aos insetos compensar a ação dos pesticidas.

Uma mudança no padrão de transcrição desses mesmos genes também foi notada em Christen, Mittner e Fent (2016), e a observação de um padrão similar em receptores de acetilcolina da barata *Periplaneta americana* (Benzidane et

al., 2017) fortalece a hipótese de que os insetos são capazes de ativar adaptações genéticas para sustentar seus processos fisiológicos mesmo enquanto passam por condições de contaminação.

6. CONCLUSÕES

A ausência de diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento controle (CTR) e os demais, durante a análise de atividade da AChE no tecido da cabeça das abelhas, demonstra o sucesso da barreira hemolinfática e sua função na proteção do sistema nervoso dos insetos, corroborando para a hipótese de maior toxicidade nos tecidos musculares. A baixa atividade da AChE no tecido do tórax nos tratamentos GER e NANO em 24 h, seguida por um aumento na atividade do tratamento NANO em 72 h, demonstra um efeito tóxico inicial seguido de uma recuperação ou supercompensação enzimática. A possibilidade de restabelecimento da atividade de acetilcolinesterase no grupo tratado com nanopartículas, padrão não observado no grupo tratado com geraniol livre, reforça a eficácia do mecanismo de entrega gradual e menor toxicidade desse tipo de composto à organismos não-alvo.

Esse resultado demonstra que os biopesticidas combinados com a nanotecnologia representam uma ferramenta promissora para maior sustentabilidade em culturas agrícolas, contribuindo para menor risco ecotoxicológico em agentes polinizadores.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. L. *et al.* Can atrazine loaded nanocapsules reduce the toxic effects of this herbicide on the fish *Prochilodus lineatus*? A multibiomarker approach. **Science of the Total Environment**, v. 663, p. 548-559, 2019.
- AMEEN, Ayesha. Green Revolution: A Review. **International Journal of Advances in Scientific Research**, Scholar Science Journals, 2018.
- ASCHER, J. S.; PICKERING, J. Bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). **Discover Life**, 2024. Disponível em: < https://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species&flags=HAS: >. Acesso em: 1 de dezembro de 2025.
- AYOUB, L. *et al.* Exposure to organophosphate insecticides induces behavioral changes and acetylcholinesterase inhibition in *Apis mellifera*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 287, 2024.
- BAKRY, A. M. *et al.* Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 143-182, 2016.
- BENZIDANE, Y. *et al.* Subchronic exposure to sublethal dose of imidacloprid changes electrophysiological properties and expression pattern of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in insect neurosecretory cells. **NeuroToxicology**, v. 62, p. 239-247, 2017.
- BOTINA, L. L. *et al.* Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). **MethodsX**, v. 7, 2020.
- BRUSCA, R. C.; MOORE, W.; SHUSTER, S. M. **Invertebrados**. 3. ed. 2016.
- CHAM, K. O. *et al.* Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 36–48, 2019.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. 5. ed. Estados Unidos da América, 2013.
- CAETANO, T. S. G. *et al.* A importância das abelhas sem ferrão na polinização das culturas agrícolas no Brasil. **Revista DELOS**, Curitiba, v. 17, n. 61, p. 01-14, 2024.
- CHRISTEN, V.; MITTNER, F.; FENT, K. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science & Technology**, 2016.

COLIN, M. E. et al. A Method to Quantify and Analyze the Foraging Activity of Honey Bees: Relevance to the Sublethal Effects Induced by Systemic Insecticides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 47, p. 387-395, 2014.

DAMALAS, C. A.; KOUTOUBRAS, S. D. Current Status and Recent Developments in Biopesticide Use. **Agriculture**, v. 8, n. 1, p. 13, 2018.

DE LARA, S. S. et al. A Agricultura do agronegócio e sua relação com a intoxicação aguda por agrotóxicos no Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 15, p. 1-19, 2019.

DE LIRA, M. H. P. et al. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 11050, p. 1-11, 2020.

DE SOUZA, F. C et al.. Thiamethoxam toxicity on the stingless bee *Friesiomelitta varia*: LC₅₀, survival time, and enzymatic biomarkers assessment. **Chemosphere**, v. 363, 2024.

DITTA, Allah. How helpful is nanotechnology in agriculture? **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 3, n. 3, 2016.

DECIO, P. et al. Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2021.

Petronilho, E. C.; Figueroa-Villar, J. D. Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 671-686, 2014.

GABOARDI, S. C.; CANDIOTTO, L. Z. P.; PANIS, C. Agribusiness in Brazil and its dependence on the use of pesticides. **Hygiene and Environmental Health Advances**, v. 8, 2023.

GAUTHIER, M. et al. Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 8, 2018.

GRÜNEWALD, B; SIEFERT, P. Acetylcholine and Its Receptors in Honeybees: Involvement in Development and Impairments by Neonicotinoids. **Insects**, v. 10, n. 420, 2019.

GRÜTER, C. **Stingless Bees: Their Behaviour, Ecology and Evolution**. 1. ed. Bristol, 2020.

HAMDAN, M. F. et al. Green Revolution to Gene Revolution: Technological Advances in Agriculture to Feed the World. **Plants** **2022**, v. 11, n. 1297, 2022.

HU, K.; MCCLEMENTS, D. J. Fabrication of surfactant-stabilized zein nanoparticles: A pH modulated antisolvent precipitation method. **Food Research International**, v. 64, p. 329-335, 2014.

IHARA, M.; MATSUDA, K. Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. **Current Opinion in Insect Science**, 2018.

KAH, M. et al. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v. 13, p. 677-684, 2018.

KASSAI, M. R. Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 79, p. 184-197, 2018.

KHALIQ, M. U. et al. Pluronic F-68 and F-127 Based Nanomedicines for Advancing Combination Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 2102, 2023.

KLUSER, Stéphane, PEDUZZI, Pascal. Global Pollinator Decline: A Literature Review. **Environment Alert Bulletin**, v. 8, 2007.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. **Biopesticides International**, v.4, n.1, p. 63-84, 2008.

MCGREGOR, S. E. **Insect Pollination of Cultivated Crop Plants**. 1. ed. Washington, 1976.

MELO, Gabriel A. R. **Catálogo Moure**, 2022. Disponível em: < <https://moure.cria.org.br/> >. Acesso em: 18 de novembro de 2025.

MENEZES, C. et al. **Abelhas sem ferrão relevantes para a meliponicultura no Brasil**. São Paulo, 2023.

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

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Agropecuária Brasileira em Números**, 2020. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros/agropecuaria-brasileira-em-numeros-abril-de-2020> >. Acesso em: 18 de novembro de 2025.

NASCIMENTO, J. E. et al. **Catálogo polínico de um fragmento alterado de Floresta Estacional Semidecidual da região de Maringá, Paraná**. 2022.

NUNES, Bruno. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology. In: WHITACRE, D. M. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Springer, 2014. p. 29-59.

LEI, Y. et al. Pharmacological Properties of Geraniol – A Review. **Planta Med**, v. 85, p. 48-55, 2019.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals?. **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

ORGANIZAÇÃO PARA COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **OECD guidelines for the testing of chemicals: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test**. N° 213. Paris: OECD Publishing, 1998.

PAOLI, M; GIURFA, M. Pesticides and pollinator brain: How do neonicotinoids affect the central nervous system of bees?. **European Journal of Neuroscience**, v. 60, p. 5927–5948, 2024.

PIRES, C. S. S. et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, 2016.

Pollinators Fact Sheet. **Natural Resources Conservation Service**, Estados Unidos, Junho de 2012. Disponível em: < https://www.nrcs.usda.gov/sites/default/files/2022-10/pollinators_fact_sheet.pdf>. Acesso em: 16 de novembro de 2025.

POTTS, S. G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, p. 220-229, 2016.

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

RECH, A. R. et al. **Biologia da Polinização**. 1. Ed. Rio de Janeiro, 2014.

ROGERIO, C. B. *et al.* Cellulose hydrogels containing geraniol and icaridin encapsulated in zein nanoparticles for arbovirus control. **ACS Applied Bio Materials**, v. 5, n. 3, p. 1273-1283, 2022.

ROSA, A. S. et al. The stingless bee species, *Scaptotrigona aff. depilis*, as a potential indicator of environmental pesticide contamination. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 8, p. 1851–1853, 2015.

SANTOS, Willian de Paula. Efeitos de exposições agudas ao geraniol em girinos Aquarana catesbeiana: comparação entre as formas livre e nanoencapsulada. 2024. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

SILVA, M. B. et al. Efeitos do imidacloprido sobre o comportamento das abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 3, n. 1, 2016.

SMITH, M. R. et al. Effects of decreases of animal pollinators on human nutrition and global health: a modelling analysis. **The Lancet**, v. 368, p. 1964-1972, 2015.

TAVARES, Isabela Toninato. Exposições orais de abelhas *Scaptotrigona postica* ao geraniol e nanogeraniol: mortalidade, estresse oxidativo e comportamento. 2025. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

UMAR, A. M.; AISAMI, A. Acetylcholinesterase Enzyme (AChE) as a Biosensor and Biomarker for Pesticides: **A Mini Review. Bulletin of Environmental Science & Sustainable Management**, v. 4, n. 1, p. 7-12, 2020.

WALKER, C, H et al. **Principles of Ecotoxicology**. 3. ed. 2005.

WANG, D. et al. Joint toxic effects of thiamethoxam and flusilazole on the adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Environmental Pollution**, v. 315, 2023.

WILLIAMSON, S. M. Exposure to Acetylcholinesterase Inhibitors Alters the Physiology and Motor Function of Honeybees. **Frontiers in Physiology**, v. 4, n. 13 2023.