



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NATÁLIA UEMURA

**OS IMPACTOS DE AGROTÓXICOS SOBRE AS ABELHAS  
NATIVAS SEM FERRÃO (APIDAE, MELIPONINI)**

---

Londrina  
2022

NATÁLIA UEMURA

**OS IMPACTOS DE AGROTÓXICOS SOBRE AS ABELHAS  
NATIVAS SEM FERRÃO (APIDAE, MELIPONINI)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Silvia Helena Sofia

Londrina  
2022

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

Uemura, Natália .

Os impactos de agrotóxicos e da espécie introduzida *Apis mellifera* sobre as abelhas-sem-ferrão (Apidae, Meliponini) / Natália Uemura. - Londrina, 2022. 129 f.

Orientador: Silvia Helena Sofia.

Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Café - Tese. 2. Apoidea - Tese. 3. Polinizadores - Tese. 4. Inseticidas - Tese. I. Sofia, Silvia Helena . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 574

NATÁLIA UEMURA

**OS IMPACTOS DE AGROTÓXICOS SOBRE AS ABELHAS  
NATIVAS SEM FERRÃO (APIDAE, MELIPONINI)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Doutora.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Helena Sofia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Éverton Ricardi Lozano da Silva  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR – Dois Vizinhos

---

Profa. Dra. Maria Cristina Gaglianone  
Universidade Estadual do Norte Fluminense -  
UENF

---

Profa. Dra. Michele Potrich  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR – Dois Vizinhos

---

Profa. Dra. Solange Cristina Augusto  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Londrina, 13 de abril de 2022.

## AGRADECIMENTOS

*À Universidade Estadual de Londrina. Minha querida UEL, que me proporcionou viver momentos maravilhosos, conhecer pessoas incríveis e fazer amigos para toda a vida.*

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPG-CB) por todo conhecimento compartilhado durante minha formação.*

*À Coordenação e Secretaria do PPG-CB pelo todo suporte ao desenvolvimento deste trabalho e ao Departamento de Biologia Geral pelo suporte físico proporcionado.*

*À Capes e Fundação Araucária, pela concessão da minha bolsa de estudos.*

*Ao CNPq, Associação A.B.E.L.H.A., IBAMA, MCTI/Governo Federal, pelo apoio financeiro e bolsa de apoio técnico recebida.*

*À profa. Silvia, que me acompanhou durante toda a trajetória na Universidade, desde a graduação até o doutorado. Agradeço por todos esses anos de ensinamentos, dedicação, inspiração e paciência! Você contribuiu muito para o meu crescimento pessoal e profissional. Minha eterna gratidão por tudo o que me ensinou!*

*Aos professores membros da banca examinadora de qualificação e da defesa. Meus profundos e sinceros agradecimentos, por dedicarem seu tempo, a fim de contribuírem com a melhoria deste trabalho.*

*À Profa. Dra. Claudia B.R. Martinez por todo o apoio e ajuda nas análises. Obrigada por todo o incentivo e por ensinar de forma tão afetuosa.*

*À profa. Dra Nédia Ghisi e ao Dr. Lucas Battisti, por serem essenciais no desenvolvimento da meta-análise e por nos ajudarem com as dúvidas que surgiram.*

*Aos técnicos de laboratório e demais funcionários pelo apoio nas pesquisas, em especial ao Robson Rockembacher, pela dedicação e ajuda nos trabalhos de campo.*

*Aos proprietários dos cultivos de café, por possibilitarem a realização das coletas e se disponibilizarem em contribuir com a pesquisa.*

*Ao Dr. Gustavo Sera, pela disponibilidade e auxílio para as coletas que ocorreram no IAPAR.*

*Aos amigos do LAGEA, que compartilham o amor pelas abelhinhas. Minha gratidão pela ajuda, companhia e parceria durante esse tempo.*

*Aos meus pais e meu irmão, meus alicerces e grandes incentivadores, que sempre me apoiaram em todas as decisões e me possibilitaram chegar até aqui.*

*Ao meu amor, Rafael, por todo o apoio, companheirismo e paciência (principalmente nos períodos finais do doutorado). Obrigada por alegrar os meus dias e ser abrigo, nos momentos difíceis.*

*E à todas as pessoas que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização*

*deste trabalho, a minha profunda gratidão.*

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

UEMURA, Natália. **Os impactos de agrotóxicos e da espécie introduzida *Apis mellifera* sobre as abelhas-sem-ferrão (Apidae, Meliponini)**. 2022. 154 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## RESUMO

O declínio em populações de abelhas e outros polinizadores tem atraído a atenção de pesquisadores e órgãos governamentais e não-governamentais no mundo todo. Várias são as causas atribuídas a este declínio, dentre as quais está o uso de agrotóxicos. No caso das abelhas-sem-ferrão (Apidae, Meliponini), pesquisas realizadas principalmente no Brasil, um dos países detentores da maior diversidade de espécies deste grupo, indicam os efeitos negativos de diversos agrotóxicos para várias espécies, mesmo quando usado em doses recomendadas pelo fabricante. Além dos agrotóxicos, o desmatamento e perda de habitats são causas também apontadas para o declínio dos polinizadores. No estado do Paraná, que originalmente era recoberto em quase 100% de seu território pela Mata Atlântica, a devastação foi severa, restando hoje cerca de 5% da vegetação original. No norte do estado, a substituição da floresta por cultivos do café ocorreu abruptamente. Embora seja uma espécie autogâmica, os polinizadores, principalmente abelhas, acarretam ganhos diretos na produção e qualidade dos grãos produzidos. Contudo, ainda faltam estudos investigando a diversidade de abelhas visitantes das flores do cafeeiro no Paraná. Apesar de *Apis mellifera* L., uma espécie introduzida, ser comum nas flores do cafeeiro, alguns estudos mostram que abelhas-sem-ferrão estão também entre os visitantes e polinizadores importantes deste cultivo. Neste contexto, este trabalho teve como objetivos investigar: i) os possíveis efeitos dos principais agrotóxicos usados na cafeicultura para espécies de abelhas nativas sem ferrão; ii) a abundância, riqueza e diversidade de espécies de abelhas em áreas de cultivo do café no norte do Paraná. Para a análise dos efeitos dos agrotóxicos foi realizada uma revisão bibliográfica sobre as metodologias desenvolvidas para análise dos efeitos subletais de herbicidas, inseticidas e fungicidas sobre diferentes espécies de abelhas-sem-ferrão. Foi realizada ainda, uma meta-análise da mortalidade causada por inseticidas sobre este grupo de abelhas. Nas análises de campo, as abelhas foram amostradas com rede entomológica, durante a floração do café em cinco áreas deste cultivo agrícola, no norte do estado do Paraná. Os resultados da meta-análise obtidos a partir de dados de 25 estudos revelaram maior mortalidade para as abelhas expostas a diferentes inseticidas quando comparadas ao grupo controle, mesmo quando consideradas as doses recomendadas pelo fabricante, ambientalmente relevantes ou ainda nas mais baixas doses testadas nos estudos. Em avaliações dos efeitos subletais nos artigos avaliados, foi observado maior efeito negativo de agrotóxicos sobre o comportamento, a morfologia e a histologia das abelhas do grupo experimental em relação ao controle. O levantamento de espécies de abelhas em cultivos agrícolas revelou a presença de 13 espécies identificadas, com elevada dominância de *Apis mellifera* (62% a 91%) nas cinco áreas amostradas. A abundância de abelhas amostradas nas áreas variou de 318 a 3644 indivíduos. A riqueza de Meliponini variou de duas a oito espécies por área e a abundância relativa do grupo por área variou de menos de 2% a 34,9%. Sugere-se que fatores como a perda de vegetação nativa e a presença da abelha melífera respondam, pelo menos, em parte pela baixa a riqueza e abundância de

abelhas-sem-ferrão na maioria das áreas.

**Palavras-chave:** apoidea; café; polinizadores; inseticidas; meta-análise

UEMURA, Natália. **The impacts of pesticides and the introduced species *Apis mellifera* on stingless bees (Apidae, Meliponini)**. 2022. 154 p. Thesis (Doctorate degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

## ABSTRACT

The decline in populations of bees and other pollinators has attracted the attention of researchers and governmental and non-governmental bodies around the world. There are several causes attributed to this decline, among which is the use of pesticides. In the case of stingless bees (Apidae, Meliponini), research carried out mainly in Brazil, one of the countries with the greatest diversity of species in this group, indicates the negative effects of several pesticides for several species, even when used in doses recommended by the manufacturer. In addition to pesticides, deforestation and loss of habitats are also cited as causes for the decline of pollinators. In the state of Paraná, which was originally covered in almost 100% of its territory by the Atlantic Forest, the devastation was severe, leaving today about 5% of the original vegetation. In the north of the state, the replacement of the forest by coffee plantations occurred abruptly. Although it is an autogamous species, pollinators, mainly bees, cause direct gains in the production and quality of the grains produced. However, there is still a lack of studies investigating the diversity of bees visiting coffee flowers in Paraná. Although *Apis mellifera* L., an introduced species, is common in coffee flowers, some studies show that stingless bees are also among the important visitors and pollinators of this crop. In this context, this study aimed to investigate: i) the possible effects of the main pesticides used in coffee growing on native stingless bee species; ii) the abundance, richness and diversity of bee species in coffee growing areas in northern Paraná. To analyze the effects of pesticides, a literature review was carried out on the methodologies developed to analyze the sublethal effects of herbicides, insecticides and fungicides on different species of stingless bees. A meta-analysis of mortality caused by insecticides on this group of bees was also performed. In field analyses, bees were sampled with an entomological net during coffee flowering in five areas of this agricultural crop, in the north of the state of Paraná. The results of the meta-analysis obtained from data from 25 studies revealed higher mortality for bees exposed to different insecticides when compared to the control group, even when considering the doses recommended by the manufacturer, environmentally relevant or even at the lowest doses tested in the studies. In evaluations of the sublethal effects in the evaluated articles, a greater negative effect of pesticides on the behavior, morphology and histology of bees in the experimental group was observed in relation to the control. The survey of bee species in agricultural crops revealed the presence of 13 identified species, with a high dominance of *Apis mellifera* (62% to 91%) in the five sampled areas. The abundance of bees sampled in the areas ranged from 318 to 3644 individuals. Meliponini richness ranged from two to eight species per area and the relative abundance of the group per area ranged from less than 2% to 34.9%. It is suggested that factors such as the loss of native vegetation and the presence of the honey bee account at least in part for the low richness and abundance of stingless bees in most areas.

**Key words:** apoidea; coffee; polinators; insecticides; meta-analysis

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** – (A) Porcentagem dos tipos de exposição aos agrotóxicos (tópica, oral e contato) em abelhas-sem-ferrão, nos trabalhos publicados que avaliaram os efeitos de agrotóxicos neste grupo de abelhas. (B) Porcentagem de estudos que avaliaram os tipos de estágio de vida (larval ou adulto) de abelhas-sem-ferrão expostas a diferentes tipos de agrotóxicos (Dados referentes aos trabalhos publicados de 2011 a 2021, n = 52) .....38
- Figura 2** – (A) Porcentagem da utilização de diferentes classes de agrotóxicos nos estudos que avaliaram os efeitos subletais destes produtos em espécies de abelhas-sem-ferrão. (B) Espécies de abelhas-sem-ferrão, utilizadas na exposição a agrotóxicos e avaliação de seus efeitos subletais. (Dados referentes aos trabalhos publicados de 2011 a 2021, n = 52) .....40
- Figura 3** – Os três tipos de exposição (tópica, contato e oral) mais comuns nas análises de efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão, nos trabalhos analisados (n = 52).....43

### CAPÍTULO 2

- Fig. 1** – Flowchart containing the papers found and selected according to the search keywords in the databases, resulting in 81 analyzed datasets. Adapted of PRISMA (2015) .....95
- Fig. 2** – Papers analyzed in this study, which evaluated the effects of different insecticides on mortality/survival of native stingless bees. The values of the first column represent the summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values  $E_v/Trt$  and  $E_v/Ctrl$  is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values (I<sup>2</sup> and P) .....97
- Fig. 3** – Forest plot with the results obtained from the analyzed studies, categorized by life stage. The values of the first column

represent the summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values (I2 and P) .....99

**Fig. 4 –** Forest plot with the results obtained from the analysed studies, categorized by type of exposure. The values of the first column represent summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values (I2 and P) .....102

**Fig. 5 –** Forest plot with the results obtained from the analyzed studies, categorized by insecticide type. The values of the first column represent summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values (I2 and P) .....103

**Fig. 6 –** Forest plot with the results obtained from the analysed studies, categorized by bee species. The values of the first column represent summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values (I2 and P) .....104

**Fig. 7 –** Funnel plot for the association of bee mortality with insecticides exposure. The X-axis represents the observed outcome and the Y – Axis represents the standard error .....87

### CAPÍTULO 3

**Figura 1 –** Localização das cinco cidades na região norte do estado do Paraná, onde foram realizadas as coletas de abelhas em plantações de café: IAPAR (Londrina – preto), Assaí (azul),

Congonhinas (rosa), Santa Mariana (verde) e Ribeirão do Pinhal (amarelo).....134

**Figura 2** – Abundância de abelhas e outros insetos coletados nas amostragens realizadas em flores de cafeeiros localizados em cinco diferentes áreas da região norte do estado do Paraná: Assaí, Congonhinas (CG), IAPAR, Santa Mariana (SM) e Ribeirão do Pinhal (RP).....139

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Levantamento de estudos que utilizaram metodologias de análise de efeitos subletais após a exposição (O - Oral, C - Contato, T – Tópica) de agrotóxicos em diferentes estágios de vida (A - Adulto, L – Larva) de abelhas-sem-ferrão. (Siglas das análises: AC - Análise do cérebro, AE - Análise enzimática, AI - Análise do intestino, ATM - Análise Túbulos de Malpighi, CA – Comportamento alimentar, CS - Comportamento social, EC – Ensaio Cometa, MC - Massa corporal, ME - Morfologia externa, REP - Reflexo de Extensão da Probóscide, TL - Teste de locomoção, TR - Taxa respiratória, TV - Teste de voo).....36
- Tabela 2** – Diferentes análises (comportamentais, bioquímicas, fisiológica e morfológicas) realizadas pelos trabalhos avaliados nesta revisão, após exposição de abelhas-sem-ferrão à distintas classes de agrotóxicos. Entre parênteses, o número de estudos que utilizaram determinada análise. (Dados referentes aos trabalhos publicados de 2011 a 2021, n = 52) .....39
- Tabela 3** – Classificação e modo de ação dos inseticidas utilizados nos estudos que avaliaram os efeitos subletais destes produtos em espécies de abelhas-sem-ferrão (Dados referentes aos trabalhos publicados de 2011 a 2021, n = 52) .....40

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1** – Abundância e composição de insetos coletados nas amostragens realizadas em flores de cafeeiros localizados em cinco diferentes áreas da região norte do Estado do Paraná: Assaí, Congonhinhas (CG), IAPAR, Santa Mariana (SM) e Ribeirão do Pinhal (RP).....138

### SUPLEMENTARES

- Table S1** – Data taken from the articles analysed in the meta-analysis. Studies indicated by numbers, authors, type of exposure, life

stage, studied species, chemical group, exposure time, number of alive and dead bees, from control group (AC and DC, respectively), as well as value of analysed dose and number of alive and dead bees, from the experimental group (AT and DT, respectively) (Lines 1, 32, 33 and 40 were removed due to problems with data analysis) .....125

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO 1: BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE EFEITOS SUBLETAIS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS-SEM- FERRÃO (APIDAE: MELIPONINI): UMA REVISÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>PRINCIPAIS METODOLOGIAS E RESULTADOS OBTIDOS NOS TRABALHOS ANALISADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>COSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO 2: A META-ANALYSIS EVALUATING THE MORTALITY OF STINGLESS BEES EXPOSED TO DIFFERENT INSECTICIDES.....</b>	<b>86</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>87</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>88</b>
<b>MATERIAL AND METHODS .....</b>	<b>92</b>
<b>RESULTS.....</b>	<b>95</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>104</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>109</b>
<b>FIGURE CAPTIONS.....</b>	<b>111</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>113</b>
<b>SUPPLEMENTARY MATERIAL .....</b>	<b>124</b>

<b>CAPÍTULO 3: A DOMINÂNCIA DE APIS MELLIFERA EM ÁREAS</b>	
<b>CAFEIRAS NO NORTE DO PARANÁ .....</b>	<b>130</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>130</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>131</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>133</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>135</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>139</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>145</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>154</b>

## APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado representa um dos produtos, gerados com o desenvolvimento de um amplo projeto intitulado “*Serviço de polinização nas principais regiões produtoras de café no Brasil: biodiversidade, avaliação bioeconômica e intensificação ecológica*”, que obteve recursos Edital no. CNPq/MCTIC/IBAMA/Associação A.B.E.L.H.A. Nº 32/2017. Por isso, na Introdução Geral apresentada a seguir são abordados alguns aspectos relacionados à história da colonização do Norte do Estado do Paraná, que teve forte relação com o cultivo do cafeeiro. A tese encontra-se dividida, assim, em: i) uma **Introdução Geral**, abordando aspectos como a biologia das abelhas nativas sem ferrão (tribo Meliponini), foco principal deste trabalho, o importante papel ecológico desempenhado por estas abelhas como polinizadores tropicais, a ameaça dos agrotóxicos para as populações deste grupo de abelhas e, como destacado, um breve histórico da cafeicultura durante a colonização do Norte do Paraná; ii) **Capítulo I**: uma revisão bibliográfica, apresentada na forma de manuscrito, sobre as metodologias que têm sido utilizadas para a análise de efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão (tribo Meliponini); iii) **Capítulo II**: uma meta-análise, que avaliou, com base em um conjunto de artigos disponíveis na literatura, a mortalidade de abelhas-sem-ferrão após a exposição a diferentes inseticidas em doses e/ou concentrações abaixo da DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>. Este segundo capítulo está também na forma de um manuscrito submetido à revista *Environmental Pollution*, estando sob análise de revisores; iv) **Capítulo III**: apresentado na forma de um manuscrito, trazendo os resultados sobre o conjunto de abelhas visitantes de cultivos do cafeeiro no Norte do Paraná; v) **Conclusões**.

## I INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas são reconhecidas como os principais polinizadores na maioria dos ecossistemas terrestres naturais e agrícolas (KLEIN et al., 2007; OLLERTON et al., 2011; ZATTARA e AIZEN, 2021) e estão entre os principais agentes responsáveis pela manutenção da diversidade vegetal de florestas tropicais e subtropicais do planeta (NEFF e SIMPSON, 1993). Cerca de 75% das culturas agrícolas e 87,5% das plantas com flores dependem em algum grau da polinização por animais, sendo as abelhas, sem dúvida, os principais agentes a realizarem tal função em diversos ecossistemas terrestres (KLEIN et al., 2007; MICHENER, 2007; RICKETTS et al., 2008; OLLERTON et al., 2011). As abelhas são essenciais à polinização das angiospermas, devido à sua dependência das flores para a obtenção de recursos alimentares, como pólen, néctar e óleo; e o fato destas visitarem diariamente um número elevado de flores e espécies vegetais, em busca de alimento (MICHENER, 2007).

Existem, atualmente, mais de 20.000 espécies de abelhas catalogadas no mundo (ASCHER e PICKERING, 2020). O Brasil, possui cerca de 2000 espécies de abelhas catalogadas, mas o número pode ser ainda maior, com estimativa entre 3000 e 5000 espécies (SILVEIRA et al., 2002). De acordo com a classificação de Michener (2007), Moure et al. (2012) e Danforth (2019), as abelhas pertencem à superfamília Apoidea e estão distribuídas em sete famílias: Stenotritidae e Melittidae (ambas ausentes no Brasil), Colletidae, Andrenidae, Halictidae, Megachilidae e Apidae, sendo esta última a mais diversa em número de espécies (aproximadamente 6000 espécies), distribuídas em três subfamílias (Xylocopinae, Nomadiinae e Apinae) e 33 tribos (MICHENER, 2007).

Apesar do importante papel desempenhado pelas abelhas como polinizadores, diversos estudos realizados nas últimas décadas, têm apontado um declínio nas populações de abelhas no mundo todo (BIESMEIJER et al., 2006; GRIXTI et al., 2009; POTTS et al., 2010; LEBUHN et al., 2012; DE PALMA et al., 2017; RHODES, 2018; MILLARD et al., 2021; ZATTARA e AIZEN, 2021).

Várias são as causas que têm sido atribuídas aos declínios nas populações de abelhas, dentre as quais pode-se citar a fragmentação e perda de habitats, as quais estão relacionadas com a redução da vegetação nativa e desmatamentos (KEVAN, 1999; KREMEN et al, 2002; FREITAS et al., 2009), mudanças climáticas e a introdução de espécies capazes de competir com as abelhas nativas (POTTS et al., 2010), perda de diversidade genética (ZAYED, 2009), ou uma combinação de vários fatores como pesticidas, parasitas e falta de recursos alimentares (GOULSON et al., 2015).

Dentre todas estas causas, o uso de agrotóxicos em culturas agrícolas e uso não sustentável dos agroecossistemas (FREITAS et al., 2009; PINHEIRO e FREITAS, 2010) estão entre as principais causas de perda de diversidade das abelhas (KREMEN et al., 2002; FREITAS et al., 2009; PINHEIRO e FREITAS, 2010; KEVAN e VIANA, 2003; SANCHEZ-BAYO e GOKA, 2014; GOULSON et al., 2015).

O estado do Paraná era recoberto no passado, em quase sua totalidade (98%), por diferentes tipos de formação vegetal da Mata Atlântica e ecossistemas associados (MORELLATTO e HADDAD, 2000; OLIVEIRA-FILHO e FONTES, 2000). Na região norte do estado, onde está inserido o município de Londrina, a vegetação nativa era constituída por extensa cobertura de

Floresta Estacional Semidecidual (FES), também denominada por Floresta Tropical Semidecidual do Terceiro Planalto Paranaense (MORELLATTO e HADDAD, 2000; SOARES e MEDRI, 2002; TOREZAN, 2002).

A FES recobria uma área de solos altamente férteis de “terra roxa”, os quais são resultantes de derrames de lavas basálticas e decomposição destas na camada *Trapp*, os quais são bastante propícios para a agricultura (SOARES e MEDRI, 2002). Enquanto o desmatamento da Mata Atlântica paranaense começa a ocorrer, de forma mais perceptível, no início do século XVII em regiões mais próximas ao sul e litoral sul do estado, a colonização no norte do Paraná, com desmatamento simultâneo das florestas de interior, inicia-se no final do século XIX e continua de forma rápida e acentuada na primeira metade do século XX (SOARES e MEDRI, 2002).

Além dos solos propícios à agricultura, o fato de a região norte do Paraná estar localizada no Terceiro Planalto Paranaense (ou Planalto de Guarapuava), sob clima do tipo tropical úmido mesotérmico ou *Cfa*, conforme classificação de Köppen (IDR, 2019; MIRETSKI, 2003), com altitudes moderadas, mas podendo atingir entre 600 e 800 m em algumas localidades (MIRETSKI, 2003), favoreceu de forma preponderante o cultivo da cafeicultura, embora esta tenha sido precedida pelo ciclo da extração de madeira na região (SOARES e MEDRI, 2002).

O ciclo do café no estado do Paraná iniciou-se a partir da extensão dos cafeeiros paulistas. A produção de café alterou a agricultura paranaense e trouxe desenvolvimento e crescimento para o estado (PRIORI et al., 2012). O café se tornou, alguns anos depois, a cultura mais valorizada, acarretando a

chegada de fazendeiros de outros lugares, os quais buscavam terras para o plantio do fruto (PRIORI et al., 2012).

O grande avanço na agricultura acarretou a devastação de grande parte da vegetação da região (PRIORI et al., 2012). A substituição das matas e florestas pelas estradas e cafezais ocorreu para promover o desenvolvimento econômico. Em apenas um século (1890 a 1990) o estado do Paraná reduziu sua cobertura florestal de 16.762.600 hectares, ou 83,41% de seu território, para cerca de 872.600 hectares, ou 5,20% de seu território (GUBERT-FILHO, 2010).

Na década de 1960, as políticas governamentais incentivavam a racionalização do plantio da cafeicultura e diversificação do uso da terra, com estímulos para plantio de culturas como soja, milho e trigo. Em 1975, a “geada negra”, que afetou parte do estado do Paraná, ocasionou um grande declínio na produção cafeeira, fazendo com que muitos cafeicultores utilizassem os incentivos governamentais para a diversificação da produção. Dessa forma, o plantio do café foi substituído em grande parte, por novas culturas agrícolas, como soja e milho (PRIORI et al., 2012).

Atualmente, o estado do Paraná é o sexto maior produtor de café do Brasil (EMBRAPA, 2020) e o país é o maior produtor e exportador de café (*Coffea arabica* L.) e segundo maior consumidor da bebida no mundo (BRASIL, 2021). Essa espécie de planta é autofértil, ou seja, possui flores hermafroditas e pode se autopolinizar. Apesar disso, de 5 a 15% de sua polinização, pode ocorrer na forma de polinização cruzada, devido a ventos e principalmente, insetos (MATIELLO et al., 2002).

A diversificação das culturas agrícolas e o crescimento da agricultura no

estado do Paraná, conseqüentemente acarretaram um maior consumo de agrotóxicos. Entre 2012 e 2015, o consumo de agrotóxicos foi de 370.000 toneladas, tornando o estado, o 2º maior consumidor de agrotóxicos do país (VIVA SEM VENENO, 2017), onde são liberados para uso em cultivos de cafeeiro, cerca de 500 agrotóxicos (ADAPAR, 2022). Tais produtos pertencem à diferentes classes, de acordo com seu modo de ação; e são representados em sua maioria por herbicidas (42,2%), seguidos por fungicidas (25,7%), inseticidas (22,9%), inseticidas conjugados a outras classes (acaricida/bactericida/fungicida/nematicida) (7,5%), acaricidas (1,5%) e nematicidas (0,2%) (ADAPAR, 2022).

Existem diversas formulações e grupos químicos distribuídos em cada classe de agrotóxico liberado para uso em cultivos do café no Paraná. Dentre os inseticidas, por exemplo, os grupos químicos que apresentam maior quantidade de produtos liberados para uso são piretroides, organofosforados, avermectinas e neonicotinoídes (ADAPAR, 2022). Por exemplo, diversos estudos apontam que inseticidas pertencentes à tais grupos químicos, como abamectina (FERREIRA et al., 2020), acetamiprido (SILVA et al., 2017; JACOB et al., 2019), clorpirifós (SANTOS et al., 2016; DORNELES et al., 2021), imidacloprido (JACOB et al., 2019; BRITO et al., 2020), tiametoxam (GRELLA, 2017; MACÍAS-MACÍAS et al., 2020) podem causar diversos efeitos subletais em espécies de abelhas nativas sem ferrão, quando tais abelhas são expostas a estes.

Diversos estudos abordam a importância das abelhas como polinizadoras do café. As inflorescências estudadas, quando expostas aos visitantes florais, produziram maior quantidade frutos, em comparação às

plantas ensacadas, as quais não receberam a visita de polinizadores, indicando dessa forma, que a ausência de insetos visitando as flores diminuiu a produção dos grãos (ROUBIK, 2002; KLEIN et al., 2003b; DE MARCO-JR e COELHO, 2004; RICKETTS et al., 2008; MALERBO-SOUZA e HALAK, 2012; FERRAZ-SILVA, 2013; TEIXEIRA, 2019). Além disso, estudos apontam valores maiores no peso médio dos grãos em plantas não ensacadas, em comparação às plantas ensacadas, as quais não receberam a visita de polinizadores (ROUBIK, 2002; RICKETTS et al., 2008).

Porém, a crescente utilização de agrotóxicos e consequente exposição das abelhas a estes, comprometem a saúde de abelhas nativas sem ferrão e a manutenção de suas colônias (TOMÉ et al., 2012). Tais abelhas são assim denominadas por possuírem um ferrão atrofiado (MICHENER, 2007). Pertencem ao grupo monofilético dos Apidae corbiculados, no qual as fêmeas possuem uma corbícula (ou “cesta de pólen”) no terceiro par de pernas. As abelhas-sem-ferrão compõem a tribo Meliponini, a qual reúne quase 600 espécies altamente eussociais, que formam colônias perenes e estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (MICHENER, 2013; GRÜTER, 2020). O grupo é bastante diverso quanto ao tamanho, coloração, hábitos de nidificação e comportamento de suas espécies (NOGUEIRA-NETO, 1997; MICHENER, 2007). Estima-se que no Brasil existam aproximadamente 330 espécies de abelhas-sem-ferrão (PEDRO, 2014).

No Brasil, tais abelhas estão sofrendo também declínio em suas populações devido principalmente, à três causas principais: desmatamento, introdução de espécies não-nativas e intensificação da agricultura (FREITAS et al., 2009). Particularmente, no caso da intensificação agrícola, algumas

monoculturas reduzem a disponibilidade de alimentos para as abelhas, enquanto o uso de agrotóxicos constitui outro componente negativo com prejuízos à sobrevivência das populações de diferentes espécies (FREITAS et al., 2009).

Dessa forma, o presente estudo teve o objetivo de avaliar através de uma revisão bibliográfica, as metodologias que têm sido utilizadas na análise de efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão. Além disso, a partir de artigos disponíveis na literatura, realizar uma meta-análise sobre a mortalidade de abelhas-sem-ferrão após a exposição a diferentes inseticidas em baixas doses e/ou concentrações. Por fim, foi realizado um levantamento de abelhas visitantes de cultivos do cafeeiro na região norte do estado do Paraná.

## OBJETIVOS

### GERAL

Compilar as metodologias que têm sido desenvolvidas na análise de efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão; analisar, com base em dados da literatura a mortalidade de abelhas-sem-ferrão expostas a diferentes inseticidas em doses e/ou concentrações abaixo da  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  e fazer um levantamento das abelhas visitantes de cultivos do cafeeiro na região norte do estado do Paraná.

### ESPECÍFICOS

- Reunir estudos que utilizam metodologias para a análise de efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão;
- Fazer um levantamento das metodologias mais utilizadas e os tipos de análise que têm sido desenvolvidas;
- Relatar os resultados que têm sido publicados sobre os efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão;
- Realizar meta-análise a fim de avaliar os efeitos de doses/concentrações abaixo da  $DL_{50}$  e  $CL_{50}$  de inseticidas sobre a mortalidade de abelhas-sem-ferrão, a partir de um conjunto de artigos disponíveis na literatura;
- Fazer um levantamento da riqueza e abundância de abelhas visitantes de cultivos do cafeeiro na região norte do Estado do Paraná.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAPAR – Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. **Agrotóxicos liberados para uso no cultivo do café.** Disponível em: <http://celepar07web.pr.gov.br/agrotoxicos/pesquisar.asp>. Acesso em: 11 mar. 2022.

BIESMEIJER, J. C.; ROBERTS, S. P. M.; REEMER, M.; et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v.313, p.351-354. 2006.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **No dia internacional do café, conheça os tipos únicos da bebida no Brasil.** 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/dia-internacional-do-cafe>. Acesso em: 10 out. 2021.

BRITO, P.; ELIAS, M.; SILVA-NETO, C.; et al. 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.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. **Meliponini Lepeletier, 1836.** In J.S. Moure, D. Urban & G.A.R. Melo (Orgs.), Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, versão online: <http://moure.cria.org.br/catalogue?id=34135>. 2013.

DANFORTH, B. N.; MINCKLEY, R. L.; NEFF, J. L. **The solitary bees: biology, evolution, conservation.** Princeton, Princeton University Press. 472p. 2019.

DE MARCO JR., P.; COELHO, F. M. Services performed by the ecosystem: forest remnants influence agricultural cultures pollination and production. **Biodiversity and Conservation**, v.13, p.1245-1255, 2004.

DE PALMA, A.; KUHLMANN, M.; BUGTER, R. Dimensions of biodiversity loss: Spatial mismatch in land-use impacts on species, functional and phylogenetic diversity of European bees. **Diversity and Distributions**, v.23, p.1435-1446. 2017.

DORNELES, A. L.; ROSA-FONTANA, A. S., SANTOS, C. F.; BLOCHTEIN, B.

Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. **Environmental Pollution**, v.272, 116414, 2021.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção dos cafés do Brasil atinge 61,62 milhões de sacas de 60 kg em 2020, volume 25% maior que 2019**. 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/56084554/producao-dos-cafes-do-brasil-atinge-6162-milhoes-de-sacas-de-60kg-em-2020-volume-25-maior-que-2019>. Acessado em 09 mar. 2022.

FERRAZ-SILVA, M. Abelhas visitantes florais e produção de frutos e sementes em café convencional. **Dissertação de Mestrado**. Vitória da Conquista, BA. 53f. 2013.

FERREIRA, M. F. O.; FRAGA, R.; BARROS, E. C.; AUGUSTO, S. C. Effects of abamectin and acetamiprid pesticides on the survival and behavior of *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* (Apidae, Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, v.61, p.37-44. 2020.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., MEDINA, L. M.; et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v.40, p.332-346, 2009.

GRELLA, T. C. Efeitos de nanodoses do inseticida tiametoxam para a abelha *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae): da absorção ao órgão alvo. **Dissertação de Mestrado**. 60f. Araras, SP. 2017.

GRÜTER, C. **Stingless Bees - Their Behaviour, Ecology and Evolution**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2020.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Combined stress from parasites, pesticides and lack of flowers drives bee declines. **Science**, v.347, n.6229, 2015.

GRIXTI, J. C.; WONG, L. T.; CAMERON S. A. FAVRET, C. Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. **Biological Conservation**, v.142, p.75-84. 2009.

GUBERT-FILHO, F. A. O desflorestamento do Paraná em um século. *In*: SONDA, C.; TRAUZYNSKI, S. C. (Org.). **Reforma agrária e meio ambiente – teoria e prática no Estado do Paraná**. Curitiba: ITCG, p.15-25. 2010.

IDR – Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná. **Atlas Climático do Estado do Paraná**. Disponível em: <http://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Atlas-Climatico>. Acesso em: 11 nov. 2021.

JACOB, C. R. O.; ZANARDI, O. Z.; MALAQUIAS, J. B.; et al. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v.224, p.65-70, 2019.

KEVAN, P. G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.373–393. 1999.

KEVAN, P. G.; VIANA, B. F. The global decline of pollination services. **Biodiversity**, v.4, n.4, p.3-8. 2003.

KLEIN, A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE, T. Fruit set of highland coffee increases with the diversity of pollinating bees. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v.270, p.955-961, 2003a.

KLEIN, A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE, T. Pollination of *Coffea canephora* in relation to local and regional agroforestry management. **Journal of Applied Ecology**, v.40, p.837-845, 2003b.

KLEIN, A.M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society Biological Sciences**, v.274, p. 303-313. 2007.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N. M.; THORP, R. W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **PNAS**, v.99, n.26, p.16812–16816. 2002.

LEBUHN, G.; DROEGE, S.; CONNOR, E. F.; et al. detecting insect pollinator declines on regional and global scales. **Conservation Biology**, v.27, n.1, p.113–120. 2012.

MACÍAS-MACÍAS, J. O.; TAPIA-RIVERA, J. C.; ALVARO D. L.; et al. *Nosema ceranae* causes cellular immunosuppression and interacts with thiamethoxam to increase mortality in the stingless bee *Melipona colimana*. **Scientific Reports**, v.10, 17021, 2020.

MALERBO-SOUZA, D. T.; HALAK, A. L. Agentes polinizadores e produção de grãos em cultura de café arábica cv. “Catuaí Vermelho”. **Científica**, v.40, p.1-11, 2012.

MATIELLO, J. B.; SANTINATO, R.; GARCIA, A. W. R.; et al. **Cultura do café no Brasil: novo manual de recomendações**. MAPA/PROCAFÉ e Fundação Procafé. 387p. 2002.

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

MICHENER, C. D. **The Meliponini**. In: Vit, P., Pedro, S. R. M, Roubik, D. (eds) Pot-honey: a legacy of stingless bees. Springer, New York, p.3–17. 2013.

MILLARD, J.; OUTHWAITE, C. L; KINNERSLEY, R; et al. Global effects of land-use intensity on local pollinator biodiversity. **Nature Communications**, v.12, n.1, 2902. 2021.

MIRETZKI, M. Morcegos do Estado do Paraná, Brasil (Mammalia, Chiroptera): riqueza de espécies, distribuição e síntese do conhecimento atual. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v.43, n.6, p.101-138, 2003.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v.32, n.4b, p.786-792, 2000.

MOURE, J. S.; MELO, G. A. R.; VIVALLO, F. Apidae. (In Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** – online version. 2012. Disponível em: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>. Acesso em: 21 jul. 2021.

NEFF, C. F.; SIMPSON, B. B. Bees, pollination systems and plant diversity. In: LaSalle J., Gauld I.D. (eds.) **Hymenoptera and Biodiversity**. Wallingford, CAB International. P.143-167. 1993.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação das abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Ed. Nogueirapis, 442p. 1997.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v.32, p.793-810. 2000.

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

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

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v.14, n.1, p.266-281, 2010.

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

PRIORI, A.; POMARI, L. R.; AMÂNCIO, S. M.; IPÓLITO, V. K. **História do Paraná: séculos XIX e XX** [online]. Maringá: Eduem. A cafeicultura no Paraná. p.91-104, 2012.

RHODES, C. J. Pollinator decline – an ecological calamity in the making? **Science Progress**, v.10, n.2, p.121–160. 2018.

RICKETTS, T. H.; DAILY, G. C.; EHRLICH, P. R.; MICHENER, C. D. Economic

value of tropical forest to coffee production. **PNAS**, v.101, p.12579-12582, 2004.

RICKTTES, T. H.; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER, I.; et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, v.11, n.5, p.499-515, 2008.

ROUBIK, D. W. The value of bees to the coffee harvest. **Nature**, v.417, p.708, 2002.

SANTOS, C. F.; ACOSTA, A. L.; DORNELES, A. L.; et al. Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. **Scientific Reports**, v.6, 31605, 2016.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. **PLoS One**, v.9, n.4, e94482, 2014.

SILVA, E. R. Doses subletais de pesticida (acetamiprido) não influenciam na sobrevivência mas afetam significativamente a comunicação da abelha *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini). **Relatório final**. Dourados, MS. 2017.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. 1st ed. Belo Horizonte. 2002.

SOARES, F. S.; MEDRI, M. E. Alguns aspectos da colonização da bacia do rio Tibagi. In: Bianchini, E.; M. E. Medri; J. A. Pimenta & O. A. Shibatta. **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, 2002.

TEIXEIRA, V. R. Efeito da polinização por abelhas na frutificação do café. **Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas**. Uberlândia, MG. 2019.

TOMÉ, H. V. V.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A. Imidacloprid-Induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PLoS ONE**, v.7, e38406, 2012.

TOREZAN, J. M. Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi. In: Bianchini,

E.; M. E. Medri; J. A. Pimenta & O. A. Shibatta. **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina, p.103-107. 2002.

VIVA SEM VENENO. **Observatório do Uso de Agrotóxicos e Consequências para Saúde Humana e Ambiental do Paraná**. 2017. Disponível em: [vivasemveneno.com.br/dados-preocupantes](http://vivasemveneno.com.br/dados-preocupantes). Acesso em: 19 ago. 2021.

ZATTARA, E. E.; AIZEN, M. A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. **One Earth**, v.4, n.1, p.114, 2021.

ZAYED, A. Bee genetics and conservation. **Apidologie**, v.40, p.237–262. 2009.

## **CAPÍTULO 1 - EFEITOS SUBLETAIS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS-SEM-FERRÃO (APIDAE: MELIPONINI): UMA REVISÃO SOBRE OS PRINCIPAIS MÉTODOS DE ESTUDO UTILIZADOS E BIOMARCADORES AVALIADOS**

Natalia Uemura<sup>1</sup> e Silvia Helena Sofia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia PR 445, 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Geral, CCB, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia PR 445, 86057-970, Londrina, Paraná, Brasil

### RESUMO

As abelhas são polinizadores essenciais em áreas cultivadas e naturais de todo o mundo. O uso de agrotóxicos é apontado como uma das suas principais causas do declínio de polinizadores, pois, além de causar a mortalidade nestes indivíduos, a exposição a esses produtos pode acarretar efeitos subletais, os quais são prejudiciais à sobrevivência. Estudos recentes abordam diferentes análises, que estimam tais efeitos em abelhas-sem-ferrão (Meliponini), importantes polinizadores de regiões tropicais e subtropicais do mundo. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura, sobre as análises utilizadas na avaliação de efeitos subletais de agrotóxicos em Meliponini e relatar os principais resultados obtidos após a exposição a doses ou concentrações subletais de diferentes agrotóxicos, durante a fase adulta ou larval, de operárias de abelhas-sem-ferrão. As pesquisas dos trabalhos aqui expostos, foram feitas utilizando-se palavras-chave, em bases de dados

eletrônicas. Os resultados apontam que diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para a análise de efeitos subletais em Meliponini e os efeitos encontrados incluem alterações bioquímicas, morfológicas, fisiológicas e comportamentais nas abelhas, após exposições a agrotóxicos. Tais alterações podem resultar em prejuízos para as atividades individuais e, em última instância, podem comprometer a sobrevivência da colmeia como um todo.

**Palavras-chave:** Inseticidas; fungicidas; herbicidas; mortalidade; análise de toxicidade

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas têm sido desenvolvidos e publicados diversos estudos que buscaram avaliar os efeitos de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão (Apidae, Meliponini). Alguns destes estudos, determinaram as concentrações letais médias ( $CL_{50}$ ) e/ou doses letais médias ( $DL_{50}$ ), de vários agrotóxicos, incluindo inseticidas (JACOB et al., 2013; COSTA et al., 2015; SOARES et al., 2015; DORNELES et al., 2017; BOFF et al., 2018; PADILHA et al., 2020; FARDER-GOMES et al., 2021a), herbicidas (ARAÚJO et al., 2020) e fungicidas (BRIGANTE et al., 2021; LEITE et al., 2021), sobre diferentes espécies de abelhas-sem-ferrão. Destaca-se que os termos  $CL_{50}$  e  $DL_{50}$  correspondem à concentração ou dose da substância, respectivamente, capaz de causar 50% de mortalidade na população estudada, em um dado intervalo de tempo (RORTAIS et al., 2005).

Há também estudos que investigaram os efeitos que doses e/ou concentrações subletais de agrotóxicos provocavam em espécies de Meliponini. Tais efeitos, embora, não causem a morte imediata, podem provocar impactos negativos na sobrevivência das abelhas, comprometendo a colônia como um todo (LOURENÇO, 2012; TOMÉ et al., 2015; MORAIS et al., 2018; ARAUJO et al., 2019; BOTINA et al., 2019; ALMEIDA et al., 2021; MIOTELO et al., 2021). Muitos estudos foram desenvolvidos no Brasil (TOMÉ et al., 2012; ROSA et al., 2016; BOFF et al., 2018; MORAIS et al., 2018; ARAUJO et al., 2019; JACOB et al., 2019; PIOVESAN et al., 2020; ALMEIDA et al., 2021; FARDER-GOMES et al., 2021a, 2021b), uma vez que este é um dos países detentores da maior diversidade de espécies de abelhas-sem-ferrão (PEDRO, 2014; GRÜTER, 2020).

Dentre os efeitos subletais que têm sido observados em estudos

recentes de exposição de abelhas-sem-ferrão à agrotóxicos estão: alterações na morfologia do cérebro (TOMÉ et al., 2012; MOREIRA et al., 2018; DINIZ et al., 2020b; FARDER-GOMES et al., 2021b; MIOTELO et al., 2021) e intestino médio (FERREIRA et al., 2013; MOREIRA et al., 2018; NASCIMENTO, 2018; DINIZ et al., 2020a), adultos com alterações na morfologia externa após a exposição a agrotóxicos no período larval (BARBOSA et al., 2015; ROSA et al., 2016; BERNARDES et al., 2018; DORNELES et al., 2021), além de comportamentos prejudicados, como dificuldade de locomoção (LOURENÇO, 2012; TOMÉ et al., 2012; BARBOSA et al., 2015) e alteração nas atividades de voo (TOMÉ et al. 2015a; MARQUES et al., 2020), paralisia, tremores (SOARES et al., 2015), letargia, desorientação (NOCELLI, et al., 2019) e hiperexcitação (LOURENÇO et al., 2012; MORAIS et al., 2018).

Os estudos que avaliam o risco de agrotóxicos, considerando apenas a mortalidade como efeito toxicológico, deixam de analisar importantes resultados de toxicidade, que podem ser prejudiciais aos polinizadores (FERNANDES, 2012; ALMEIDA et al., 2021), uma vez que vários efeitos subletais após a exposição a agrotóxicos são relatados na literatura, como mencionado anteriormente. Embora, algumas revisões envolvendo especificamente agrotóxicos e abelhas tenham sido publicadas, recentemente (BARBOSA et al., 2015; LIMA et al., 2016), a rápida velocidade em que informações têm sido geradas em novas publicações, bem como a aplicação de metodologias inovadoras que têm sido utilizadas em vários destes estudos, demandam novas revisões e atualizações na tentativa de compilar as informações, contribuindo, assim, para um entendimento maior dos resultados obtidos.

Dessa forma, a presente revisão visa tratar com maior detalhamento, os efeitos subletais descritos nas publicações que envolvem a exposição de abelhas-sem-ferrão a agrotóxicos, além de apresentar as metodologias que têm sido utilizadas para a avaliação de tais efeitos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Para o desenvolvimento desta revisão bibliográfica, foram realizadas pesquisas em bases de dados eletrônicas, como: Periódicos CAPES, Web of Science, Scopus, PubMed e Google Scholar. Como o objetivo foi analisar trabalhos que avaliaram os efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão, foram utilizadas as seguintes palavras-chave na busca: “abelhas-sem-ferrão” ou “Meliponini” e “agrotóxico”, ou “inseticida”, ou “fungicida”, ou “herbicida”, ou “acaricida”, ou “mortalidade” e “efeitos subletais”, ou “CL<sub>50</sub>” ou “DL<sub>50</sub>”, nos idiomas inglês e português, publicados até setembro de 2021.

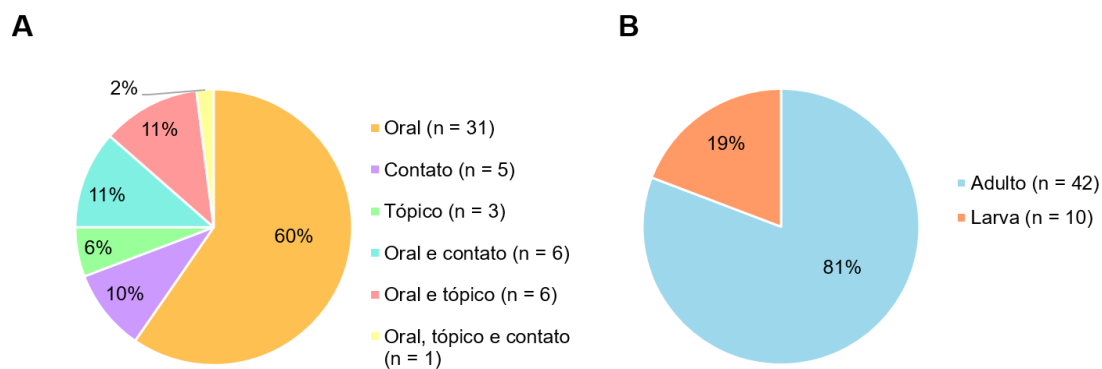
Foram encontrados, ao todo, 86 estudos que abordavam a exposição de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão. Dentre esses, 52 utilizaram metodologias que avaliaram efeitos subletais de agrotóxicos nesse grupo de abelhas (Tabela 1). Desta forma, os trabalhos que apenas determinaram as doses e/ou concentrações subletais desses produtos e não utilizaram metodologias para a avaliação dos efeitos subletais, foram excluídos desta revisão.

**Tabela 1.** Levantamento de estudos que utilizaram metodologias de análise de efeitos subletais após a exposição (O - Oral, C - Contato, T – Tópica) de agrotóxicos em diferentes estágios de vida (A - Adulto, L – Larva) de abelhas-sem-ferrão. (Siglas das análises: AC - Análise do cérebro, AE - Análise enzimática, AI - Análise do intestino, ATM - Análise Túbulos de Malpighi, CA – Comportamento alimentar, CS - Comportamento social, EC – Ensaio Cometa, MC - Massa corporal, ME - Morfologia externa, REP - Reflexo de Extensão da Probóscide, TL - Teste de locomoção, TR - Taxa respiratória, TV - Teste de voo).

Estudos	Estágio de vida	Exposição	Espécie	Agrotóxico	Análise
Almeida et al., 2021	A	O	<i>Partamona helleri</i>	Imidacloprido e mix fungicidas	TL, TR, preferência de cor
Araujo et al., 2019	L	O	<i>P. helleri</i>	Espinosade	AI, MC
Araújo et al., 2020	A	O	<i>P. helleri</i>	Mesotriona + atrazina	TL, AI
Barbosa et al., 2015	L	O	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Azadiractina e Espinosade	TL, MC, ME
Bernardes et al., 2017	A	O e C	<i>M. quadrifasciata</i> e <i>P. helleri</i>	Azadiractina	TL, TV, TR
Bernardes et al., 2018	L	O	<i>P. helleri</i>	Azadiractina	TL, ME
Boff et al., 2018	A	O	<i>M. quadrifasciata</i>	Acetamiprido + Alfa-cipermetrina	CS
Botina et al., 2019	A	O	<i>P. helleri</i>	Espinosade	TL, TV, TR
Brito et al., 2020	A	O	<i>M. quadrifasciata</i>	Imidacloprido	TL, AI, EC
Chibee et al., 2021	A	O e C	<i>Meliponula bocandei</i>	Cipermetrina	REP, AE
Costa et al., 2020	A	O	<i>M. quadrifasciata</i>	Imidacloprido	CA
Diniz et al., 2020a	A	O e C	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Acefato	AC, AI
Diniz et al., 2020b	A	O	<i>S. bipunctata</i>	Acetamiprido + Alfa-cipermetrina	AC, AI
Dorneles et al., 2021	L	O	<i>S. bipunctata</i>	Clorpirifós	ME
Farder-Gomes et al., 2021a	A	O	<i>P. helleri</i>	Fipronil	AE, AI
Farder-Gomes et al., 2021b	A	O	<i>P. helleri</i>	Fipronil	TL, AE, AC
Fermino et al., 2011	A	C	<i>Tetragonisca angustula</i> e <i>Tetragonisca fiebrigi</i>	Nicosulfom e Paraquate	AE
Ferreira et al., 2013	A	O	<i>Scaptotrigona postica</i>	Fipronil e Ácido bórico	ATM
Ferreira et al., 2020	A	C	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	Abamectina e Acetamiprido	TL, REP
Gomes, 2017	A	O e C	<i>Melipona capixaba</i>	Tiametoxam, Glifosato e Mancozeb	TV
Gomez-Escobar et al., 2018	A	C	<i>Scaptotrigona mexicana</i>	Espinosade	CA
Grella, 2017	A	O	<i>Melipona scutellaris</i>	Tiametoxam	AC, ATM, AI
Jacob, 2012	A	O e T	<i>S. postica</i>	Fipronil	AC
Jacob et al., 2015	A	O e T	<i>S. postica</i>	Fipronil	AC
Jacob et al., 2019	A	O	<i>T. angustula</i>	Acetamiprido, Imidacloprido, Tiacloprido e Tiametoxam	TL
Leite et al., 2021	A	O, T e C	<i>T. angustula</i>	Clorpirifós, Ciflumetofen e Difenconazol	Comportamento
Lourenço, 2012	A	O e T	<i>M. scutellaris</i>	Fipronil	TL, REP
Macías-Macías et al., 2020	A	O	<i>Melipona colimana</i>	Tiametoxam	Imunidade celular
Marques et al.,	A	O	<i>Plebeia lucii</i>	Espinosade e Imidacloprido	TL, TV, TR. MC

2020					
Matos et al., 2021	A	T	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Imidacloprido, Deltametrina e Espinetoram	TL, TV, CS
Miotelo et al., 2021	A	O	<i>M. scutellaris</i>	Tiametoxam	AC
Morais et al., 2018	A	T	<i>M. scutellaris</i>	Fipronil	TL, AC
Moreira et al., 2018	A	O	<i>S. bipunctata</i>	Tiametoxam	AE, AC, AI
Nascimento, 2018	A	T	<i>S. postica</i> e <i>M. scutellaris</i>	Tiametoxam	ATM, MC
Oliveira et al., 2020	A	C	<i>T. angustula</i>	Novalurom e Azadiractina	AE
Otesbelgue et al., 2018	L e A	O	<i>Plebeia droryana</i>	Imidacloprido	CS, Comportamento
Pereira et al., 2021	A	O e C	<i>S. bipunctata</i>	Cipermetrina	AE
Piovesan et al., 2020	A	O e T	<i>M. quadrifasciata</i> e <i>T. fiebrigi</i>	Abamectina, Tiametoxam, Espinetoram e Novaluron	TL
Rahman 2020	A	O e T	<i>M. scutellaris</i>	Imidacloprido e Tiametoxam	AE
Rosa et al., 2016	L	O	<i>Scaptotrigona depilis</i>	Tiametoxam	ME
Sánchez et al., 2012	A	O	<i>Plebeia moureana</i>	Espinosade	CA
Santos et al., 2016	L	O	<i>Plebeia droryana</i>	Clorpirifós	Diferenciação de castas
Seide et al., 2018	L	O	<i>M. quadrifasciata</i>	Glifosato e Imidacloprido	TL
Silva et al., 2016	A	O	<i>S. postica</i>	Imidacloprido	TL, REP
Silva et al., 2017	A	O	<i>M. quadrifasciata</i>	Acetamiprido	CS
Soares, 2012	A	O e T	<i>S. postica</i>	Imidacloprido	AI, AC, ATM
Souza, 2021	A	C	<i>S. xanthotricha</i>	Glifosato e 2,4-D	TL, REP
Tomé et al., 2012	L e A	O	<i>M. quadrifasciata</i>	Imidacloprido	TL, AC
Tomé et al., 2015a	A	O	<i>M. quadrifasciata</i>	Espinosade e Imidacloprido	TV, CS, TR
Tomé et al., 2015b	A	O e C	<i>P. helleri</i> e <i>S. xanthotricha</i>	Azadiractina, Clorantraniliprole, Imidacloprido e Espinosade	TV, CS
Tomé et al., 2017	A	O	<i>P. helleri</i>	Deltametrina e Imidacloprido	TR, MC
Viana et al., 2020	L	O	<i>M. quadrifasciata</i>	Azadiractina e Espinosade	Análise de expressão gênica

As análises de efeitos de agrotóxicos em abelhas incluem diferentes tipos de exposição (contato, tópico e oral) (Tabela 1). Alguns trabalhos utilizaram mais de uma forma de exposição aos agrotóxicos testados (Figura 1A). Além disso, podem ser analisados os efeitos em diferentes estágios de vida das abelhas (larval ou adulto), mas na maioria dos casos, os estudos abordam os efeitos em abelhas adultas. No caso dos estudos com larvas, eles foram realizados até a emergência dos adultos, para avaliação dos efeitos da exposição crônica (Figura 1B).



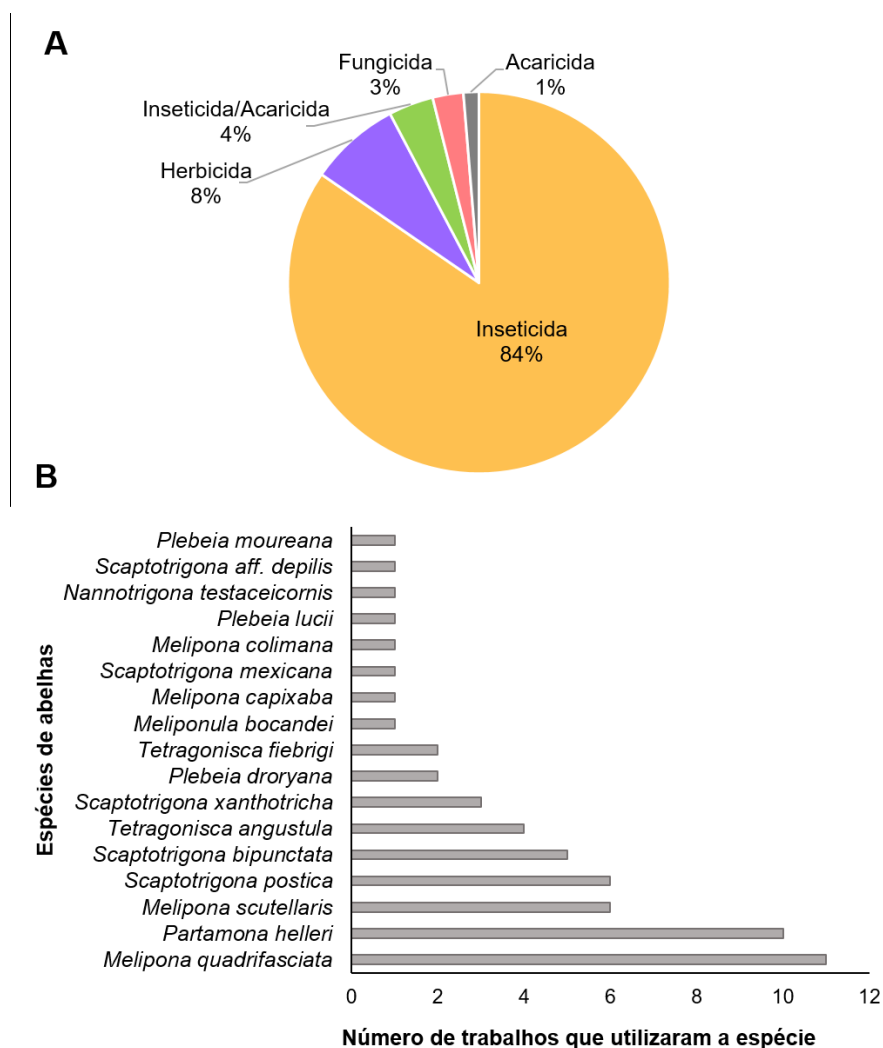
**Figura 1. (A)** Porcentagem dos tipos de exposição aos agrotóxicos (tópica, oral e contato) em abelhas-sem-ferrão, nos trabalhos publicados que avaliaram os efeitos de agrotóxicos neste grupo de abelhas. **(B)** Porcentagem de estudos que avaliaram os tipos de estágio de vida (larval ou adulto) de abelhas-sem-ferrão expostas a diferentes tipos de agrotóxicos (Dados referentes aos trabalhos publicados de 2011 a 2021, n = 52).

As análises de efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas, podem revelar alterações na morfologia interna e externa, desenvolvimento, comportamento, entre outros. Tais efeitos podem ser avaliados através de diferentes análises (Tabela 1). Nos trabalhos utilizados nesta revisão, as análises mais frequentemente utilizadas para a avaliação de efeitos subletais em abelhas-sem-ferrão, foram análises comportamentais e morfológicas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Diferentes análises (comportamentais, bioquímicas, fisiológica e morfológicas) realizadas pelos trabalhos avaliados nesta revisão, após exposição de abelhas-sem-ferrão à distintas classes de agrotóxicos. Entre parênteses, o número de estudos que utilizaram determinada análise. Dados referentes aos trabalhos publicados de 2011 a 2021, n = 52.

<b>Análises</b>				
<b>Comportamental</b>	<b>Bioquímica</b>	<b>Fisiológica</b>	<b>Morfologia interna</b>	<b>Morfologia externa</b>
Locomoção (n = 19)	Enzimas (n = 8)	Taxa respiratória (n = 6)	Cérebro (n = 11)	Apêndices (n = 4)
Voo (n = 7)	Ensaio Cometa (n = 1)		Intestino médio (n = 9)	Massa corporal (n = 4)
Interação (n = 6)	Imunidade celular (n = 1)		Túbulos de Malpighi (n = 4)	
Alimentação (n = 6)	Expressão gênica (n = 1)			
Reflexo de Extensão da Probóscide (REP) (n = 5)				

Para a avaliação de efeitos de agrotóxicos em diferentes espécies de abelhas-sem-ferrão (n = 18), a maioria dos estudos utilizou inseticidas, os quais abrangem diferentes grupos químicos (Figura 2A, B).



**Figura 2. (A)** Porcentagem da utilização de diferentes classes de agrotóxicos nos estudos que avaliaram os efeitos subletais destes produtos em espécies de abelhas-sem-ferrão. **(B)** Espécies de abelhas-sem-ferrão, utilizadas na exposição a agrotóxicos e avaliação de seus efeitos subletais. (Dados referentes aos trabalhos publicados de 2011 a 2021, n = 52).

No caso específico dos inseticidas, os quais tem diversos grupos de insetos como seu alvo específico, na Tabela 3 é apresentada uma síntese dos inseticidas mais usados em estudos com abelhas-sem-ferrão, grupos químicos a quais pertencem e modos de ação.

**Tabela 3** – Classificação e modo de ação dos inseticidas utilizados nos estudos que avaliaram os efeitos subletais destes produtos em espécies de abelhas-sem-ferrão (Dados referentes aos trabalhos publicados de 2011 a 2021, n = 52).

<b>Agrotóxico</b>	<b>Grupo químico</b>	<b>Ação</b>
Acetamiprido	Neonicotinoide	Agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina no sistema nervoso central, alterando a transmissão do sinal nas sinapses nervosas
Imidacloprido		
Tiacloprido		
Tiametoxam		
Alfa-cipermetrina	Piretroide	Retardam o fechamento dos canais de sódio após a condução do potencial de ação, reestimulando as células nervosas
Cipermetrina		
Deltametrina		
Espinetoram	Espinosina	Estimulam os receptores nicotínicos da acetilcolina nas células pós-sinápticas, com possível atuação no sistema GABA (ácido gama amino butírico)
Espinosade		
Clorantraniliprole	Antranilamida/ Diamida	Ativam os receptores de rianodina, induzindo uma contração muscular ininterrupta
Novalurom	Benzoilureia	Inibem a síntese de quitina
Fipronil	Pirazol	Antagonizam a ação do neurotransmissor inibitório GABA, impedindo que após a transmissão de um impulso nervoso, se desencadeie o processo de inibição restabelecendo o repouso do SNC
Acefato	Oragnofosforado	Ligam-se à enzima acetilcolinesterase, inibindo sua ação e causando acúmulo de acetilcolina na sinapse
Clorpirifós		

Abamectina*	Avermectinas	Modulam os canais de cloreto (Cl) e promovem um aumento da liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA) nas sinapses das células nervosas
Azadiractina**	Tetranortriterpenoi de	Bloqueiam um hormônio relacionado à metamorfose, impedindo o processo de ecdise

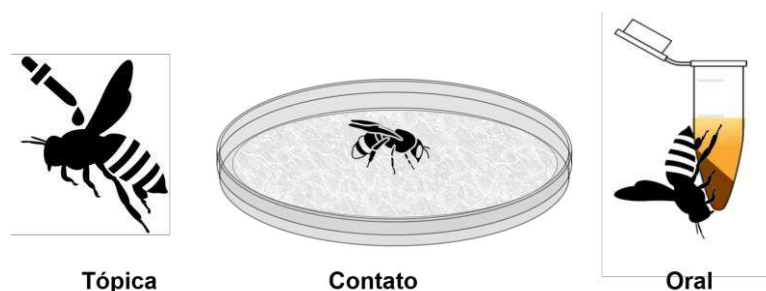
\* Inseticida e acaricida; \*\* inseticida e fungicida

A seguir será apresentada uma breve descrição das metodologias utilizadas nas diferentes análises sobre os efeitos subletais de abelhas-sem-ferrão exposta a agrotóxicos (inseticidas, herbicidas, fungicidas e acaricidas) em experimentos realizados em laboratório. São também apresentados os principais resultados encontrados nos estudos, com destaques para a relevância dos tipos de análises em estudos de toxicidade neste grupo de abelhas.

### **3 PRINCIPAIS METODOLOGIAS E RESULTADOS OBTIDOS NOS TRABALHOS ANALISADOS**

#### **3.1 FORMAS DE EXPOSIÇÃO DE ABELHAS-SEM-FERRÃO A AGROTÓXICOS**

Os testes que analisam efeitos de concentrações e/ou doses subletais geralmente são realizados por três formas de exposição: tópica, contato e/ou ingestão do agrotóxico (Figura 3); e a mortalidade e efeitos subletais são registrados de 24h até 96h após a exposição à substância (LOURENÇO et al., 2012; LEITE et al., 2021).



**Figura 3.** Os três tipos de exposição (tópica, contato e oral) mais comuns nas análises de efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão, nos trabalhos analisados (n = 52).

Para a realização dos testes de exposição tópica aos agrotóxicos, as operárias são previamente anestesiadas em baixas temperaturas (DORNELES et al., 2017, NOCELLI et al., 2019), ou expostas por poucos segundos a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) (LOURENÇO, 2012; MORAIS et al., 2018; NASCIMENTO, 2018; PADILHA et al., 2020; PIOVESAN et al., 2020; BRIGANTE et al., 2021). Usualmente com auxílio de micropipeta, aplica-se uma gota da solução a ser estudada diluída em solvente específico (o grupo controle recebe apenas o solvente, sem agrotóxico), na região do tórax da abelha (LOURENÇO, 2012; DORNELES et al., 2017; MORAIS et al., 2018; NASCIMENTO, 2018; PADILHA et al., 2020).

Já na exposição por contato, as abelhas são submetidas ao contato com papel-filtro contendo o agrotóxico borrifado na concentração a ser testada (no caso do grupo controle, é borrifada água destilada). Usualmente, utiliza-se o fundo de uma placa de Petri, a qual é forrada com o papel filtro contaminado, na qual as abelhas são deixadas em grupos, por determinado tempo (FERMINO et al., 2011; DEL SARTO et al., 2014; BERNARDES et al., 2017; ABRAHAM et al., 2018; FERREIRA et al., 2020; CHIBEE et al., 2021; PEREIRA et al., 2021; SOUZA, 2021). O contato direto das abelhas com folhas das plantas a serem avaliadas, borrifadas com o agrotóxico, é outra forma de

exposição por contato (ABRAHAM et al., 2018).

Nos testes de exposição oral, as abelhas são colocadas em gaiola plástica, na qual usualmente é acoplado um microtubo tipo *Eppendorf* perfurado nas extremidades, contendo a dose do agrotóxico a ser testado misturado ao alimento (solução de sacarose), ou, no caso do grupo controle, apenas o alimento livre de agrotóxico (BERNARDES et al., 2017; DORNELES et al., 2017; ARAÚJO et al., 2020; PADILHA et al., 2020; ALMEIDA et al., 2021; BRIGANTE et al., 2021; LEITE et al., 2021). O tempo de exposição ao agrotóxico é variável e após este, os microtubos são substituídos por outros, contendo apenas o alimento, sem agrotóxico (BERNARDES et al., 2017; DORNELES et al., 2017; BOTINA et al., 2019; ARAÚJO et al., 2020; ALMEIDA et al., 2021; BRIGANTE et al., 2021).

Alguns estudos visam avaliar os efeitos de agrotóxicos no desenvolvimento larval de abelhas-sem-ferrão e desta forma, esses indivíduos são expostos aos agrotóxicos de forma crônica, desde os primeiros dias após a eclosão, até a emergência (TOMÉ et al., 2012; BARBOSA et al., 2015; ROSA et al., 2016; BERNARDES et al., 2018; ARAUJO et al., 2019; DORIGO et al., 2019; DORNELES et al., 2021).

O alimento larval (retirado de células de cria da própria colônia) é colocado em quantidade determinada (varia para cada espécie) em cada um dos poços de uma microplaca e em seguida, delicadamente, a larva é colocada acima do alimento, com ou sem o agrotóxico. As placas são deixadas em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio), com temperatura ( $28 \pm 2$  °C) e umidade (varia durante o desenvolvimento larval) controladas durante todo o

desenvolvimento, o qual é acompanhado diariamente (BARBOSA et al., 2015; ROSA et al., 2016; BERNARDES et al., 2018; ARAUJO et al., 2019).

### 3.2 ANÁLISES DE EFEITOS CAUSADOS POR AGROTÓXICOS EM ABELHAS-SEM-FERRÃO, NOS ESTUDOS ANALISADOS

#### 3.2.1 Análises Morfológicas

##### 3.2.1.1 Morfologia interna - intestino médio

A análise de morfologia do intestino médio tem se mostrado relevante, visto que o intestino médio é o local de absorção dos nutrientes e metabolização dos produtos químicos, tornando-o um órgão importante para análises de toxicidade em abelhas (CRUZ-LANDIM, 2009). Nesta análise, as abelhas são anestesiadas e em seguida, dissecadas em solução salina para a retirada do intestino médio, o qual é posteriormente fixado e passa por procedimentos de preparação de lâminas, que são observadas em microscópio de luz (NASCIMENTO, 2018; MOREIRA et al., 2018; ARAUJO et al., 2019; ARAÚJO et al., 2020; DINIZ et al., 2020a; DINIZ et al., 2020b; FARDER-GOMES et al., 2021a). Em alguns casos, o intestino médio é analisado em microscópio eletrônico (MOREIRA et al., 2018; BRITO et al., 2020; DINIZ et al., 2020b; BRIGANTE et al., 2021) e neste caso, os procedimentos são diferentes daqueles realizados para análise em microscópio de luz.

Em indivíduos de *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 tratados com doses subletais do inseticida imidacloprido, foi relatada a maior incidência de células com núcleos picnóticos (com cromatina condensada), em relação ao grupo controle. Além disso, os indivíduos tratados apresentaram desorganização do epitélio digestivo, caracterizada pelo desprendimento

celular da membrana basal, rompimento celular e eliminação de células para o lúmen (SOARES, 2012).

Operárias da espécie *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836), após 24h da exposição à menor dose testada (subletal) do inseticida tiametoxam, apresentaram microvilosidades alongadas do intestino médio, provavelmente como uma forma de aumentar a absorção de nutrientes e prolongar a sobrevivência. Além disso, após um período prolongado de exposição (72h), foi observada a degeneração de células digestivas e sua eliminação no lúmen (MOREIRA et al., 2018). A característica de células do epitélio se despreendendo e indo em direção ao lúmen também foi observada quando abelhas da espécie *S. postica* foram expostas topicamente ao tiametoxam, além disso, também foi observado um desarranjo epitelial (NASCIMENTO, 2018). Apesar de o desprendimento celular ser comum em células digestivas (CRUZ-LANDIM, 2009), os efeitos foram maiores em abelhas expostas ao inseticida (NASCIMENTO, 2018).

Alterações morfológicas como aumento de microvilosidades, ruptura da musculatura e degeneração celular também foram evidenciadas em *S. bipunctata*, quando tratadas de forma oral e por contato com o inseticida acefato (DINIZ et al., 2020a) e quando expostas oralmente ao inseticida combinado acetamiprido e alfa-cipermetrina (DINIZ et al., 2020b). Além disso, abelhas expostas apresentaram degradação da membrana peritrófica (DINIZ et al., 2020a; 2020b), a qual protege as células do intestino de danos causados por alimentos que não foram digeridos (LANDIM, 2009).

Larvas de *Partamona helleri* (Friese, 1900) expostas ao inseticida espinosade apresentaram o epitélio com núcleos das células contendo

cromatina predominantemente condensada e citoplasma com expressiva vacuolização (indicativo de morte celular). Adultos apresentaram o epitélio do intestino médio desintegrado (ARAUJO et al., 2019). Abelhas da mesma espécie, quando tratadas com uma mistura dos herbicidas mesotriona e atrazina, também apresentaram epitélio com células digestivas com alta vacuolização e desintegração na região apical, em indivíduos tratados com a CL<sub>50</sub> (24h após exposição à mistura) (ARAÚJO et al., 2020).

Em *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 tratadas com tiametoxam, foram observadas condensação cromatínica e perda da borda em escova (GRELLA, 2017). Quando expostos ao inseticida fipronil, espécimes de *P. helleri* apresentaram alterações na morfologia do intestino médio, como desorganização do epitélio, degeneração da borda em escova, ruptura da matriz e liberação de fragmentos celulares em direção ao lúmen (FARDER-GOMES et al., 2021a).

De maneira geral, por meio dos estudos apresentados, pode-se concluir que abelhas expostas a diferentes tipos de inseticidas e herbicidas, apresentaram evidentes alterações na morfologia do intestino médio. Tais alterações podem causar redução no tempo de vida das abelhas e deixá-las mais suscetíveis a outros agentes estressores, como patógenos (ARAUJO et al., 2019).

### 3.2.1.2 Morfologia interna - túbulos de Malpighi

Os túbulos de Malpighi, relacionados à excreção de compostos químicos e absorção de água e nutrientes pela hemolinfa, são outro órgão de interesse em estudos de exposição de agrotóxicos em abelhas. A avaliação da

morfologia de tais estruturas, pode revelar mudanças estruturais induzidas por agrotóxicos.

Na metodologia utilizada para a avaliação da toxicidade nesta região do corpo, as abelhas são anestesiadas e dissecadas em temperatura ambiente, pré-fixadas durante a dissecação, com fixador apropriado. Após a retirada dos túbulos de Malpighi, estes são deixados em fixadores para melhor preservação das proteínas e polissacarídeos. Posteriormente o material é lavado e passa por uma série de procedimentos, utilização de corantes e microtomia, para então, as lâminas serem submetidas a observação em microscópio de luz (FERREIRA et al., 2013; GRELLA, 2017) e/ou microscópio eletrônico de transmissão (FERREIRA et al., 2013).

Em análises dos túbulos de Malpighi de *S. bipunctata* tratadas com o fipronil, foi relatado que o volume celular aumentou. As células excretoras apresentaram vacuolização do citoplasma, lúmen quase obstruído e acúmulo de material amorfo no lúmen, indicando um aumento no processo de excreção, para eliminação do agrotóxico. Análises de microscópio eletrônico de transmissão revelaram aumento da dilatação das microvilosidades de indivíduos do grupo tratamento, provavelmente, também indicando uma tentativa de aumento no processo de excreção do composto (FERREIRA et al., 2013).

Abelhas de *M. scutellaris* expostas ao tiametoxam apresentaram um formato irregular nas células dos túbulos de Malpighi, núcleos com indícios de picnose e deslocados para a periferia, células sendo eliminadas para o lúmen indicando morte celular e perda de material citoplasmático. Este último indica que danos estão ocorrendo no epitélio, podendo causar alterações no

funcionamento do órgão (GRELLA, 2017). Para a mesma espécie, tratada com o mesmo inseticida, também foi relatada a perda de material citoplasmático, além de acentuado inchaço das células, provavelmente ocasionado pelo aumento no metabolismo celular, na tentativa de eliminar o composto tóxico (NASCIMENTO, 2018). O inchaço celular, além de presença de núcleos picnóticos, também foram relatados por Soares (2012), ao estudarem os efeitos do imidacloprido em *S. postica*.

As alterações morfológicas nos túbulos de Malpighi apresentadas aqui, revelam indícios de toxicidade de diferentes tipos de agrotóxicos, em diversas espécies de abelhas-sem-ferrão. Tais alterações mostram que estes insetos são prejudicados pelo uso dessas substâncias, já que os túbulos de Malpighi participam da excreção de substâncias no organismo e alterações nessas regiões podem ser nocivas para os indivíduos (SOARES, 2012; FERREIRA et al., 2013; GRELLA, 2017; NASCIMENTO, 2018).

### 3.2.1.3 Morfologia interna – Cérebro

Alguns estudos têm focado na análise da morfologia e histologia cerebral de abelhas expostas à diferentes classes de agrotóxicos (TOMÉ et al., 2012; MORAIS et al., 2018; DINIZ et al., 2020b; MIOTELO et al., 2021), devido ao fato desta estrutura ser importante em diversas atividades realizadas pelas abelhas (TOMÉ et al., 2012). Tais atividades são controladas por regiões específicas do cérebro, como os corpos pedunculados, os quais são preenchidos pelos corpos celulares de neurônios, chamados células de Kenyon (FAHRBACH, 2006). Outras regiões analisadas em estudos de toxicidade são os lobos antenais e lobos ópticos, relacionados aos estímulos olfatórios e

visuais, respectivamente (AZEVEDO e NOCELLI, 2020).

Na análise da histologia cerebral, a abelha é previamente anestesiada e em seguida, seu cérebro é dissecado em solução salina, fixado e passa por diversos procedimentos até a preparação de lâminas, as quais serão observadas em microscópio de luz (TOMÉ et al., 2012; JACOB et al., 2015; FARDER-GOMES et al., 2021b) e/ou microscópio eletrônico de transmissão (MET) (JACOB et al., 2015; MIOTELO et al., 2021).

Foram observadas dilatações dos espaços intercelulares dos corpos pedunculados de *S. postica* tratadas com doses subletais de imidacloprido, indicando perda de contato celular e desorganização tecidual (SOARES, 2012). Em indivíduos da espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 expostas oralmente ao inseticida imidacloprido durante a fase larval, foram observadas alterações nos corpos pedunculados: o inseticida prejudicou o desenvolvimento e comprometeu o aumento do volume dessas estruturas, o que ocorre normalmente com o envelhecimento, em indivíduos não tratados (TOMÉ et al., 2012).

Jacob et al. (2015), ao estudarem os efeitos do fipronil em *S. postica* expostas de forma oral e tópica, relataram perfis picnóticos nas células de Kenyon dos corpos pedunculados, sugerindo morte celular. Além disso, nas análises de MET foram observadas dilatação da membrana nuclear, diminuição das cristas mitocondriais e alterações nas vesículas de Golgi, sugerindo morte celular por apoptose ou autofagia. Este estudo mostrou que apesar da metabolização de moléculas do inseticida no intestino, a exposição crônica pode causar danos neurais, afetando a sobrevivência.

Operárias de *M. scutellaris* quando expostas ao tiametoxam,

apresentaram alterações nos corpos pedunculados, com núcleos fortemente corados e espaçamento entre as células de Kenyon, o que indica a perda do contato entre as células, sinalizando desorganização tecidual (GRELLA, 2017). Em estudo semelhante, com a mesma espécie e inseticida, também foi observado o espaçamento entre as células Kenyon, além da condensação da cromatina nuclear. Além disso, por meio das análises de MET observou-se perda de cristas mitocondriais e formato irregular dos núcleos de indivíduos expostos por oito dias a doses subletais do tiametoxam (MIOTELO et al., 2021).

Ainda em *M. scutellaris*, foram observadas alterações no padrão de dispersão da heterocromatina, nos corpos pedunculados e lobos antenais, quando expostas ao fipronil (MORAIS et al., 2018). A exposição ao fipronil também provocou alterações no cérebro de *P. helleri*, como células de Kenyon com espaços intercelulares aumentados, indicando desorganização tecidual e neurópilas dos corpos pedunculados, lobos ópticos e antenais com intensa vacuolização (FARDER-GOMES et al., 2021b).

O estudo de áreas do cérebro de abelhas tratadas com agrotóxicos se mostra relevante, pois danos nos corpos pedunculados, por exemplo, podem causar aumento na atividade locomotora (FARDER-GOMES et al., 2021b). Além disso, podem levar à diminuição da capacidade de aprendizado e memória (SIVITER et al., 2018) e prejudicar a capacidade visual e olfativa, no caso de alterações nos lobos antenais e ópticos, o que pode interferir na atividade de forrageio das abelhas e prejudicar, conseqüentemente, toda a colônia (MORAIS et al., 2018; FARDER-GOMES et al., 2021b).

Para investigar possíveis alterações na estrutura da cromatina do

cérebro de abelhas expostas, alguns trabalhos utilizam a análise CEC (do inglês, *Critical Electrolyte Concentration*), a qual utiliza preparação de lâminas com cortes histológicos do cérebro, que são corados e deixados em solução de cloreto de magnésio, para posterior observação em microscópio. Em trabalhos que utilizaram esta técnica, foi observada a condensação da cromatina de células cerebrais de operárias da espécie *S. bipunctata* expostas ao tiametoxam e aos inseticidas combinados acetamiprido e alfa-cipermetrina, o que poderia estar relacionado com a inativação de genes, como resposta alternativa à ação do neonicotinoide (MOREIRA et al., 2018; DINIZ et al., 2020b).

#### 3.2.1.4 Morfologia externa

A análise dos efeitos de agrotóxicos sobre a morfologia externa de abelhas é um indicador relevante, pois estudos têm relatado que abelhas expostas a inseticidas diluídos no alimento durante o período larval, podem apresentar alterações em diferentes partes do corpo, quando emergem (BARBOSA et al., 2015; ROSA et al., 2016; BERNARDES et al., 2018; ARAUJO et al., 2019; DORNELES et al., 2021). Para esta análise, as abelhas são expostas durante o período larval.

Nesta metodologia, o alimento larval misturado à concentração do agrotóxico a ser analisado é colocado em poços de microplacas (na quantidade total a ser consumida pela larva, que varia para cada espécie). Posteriormente, as larvas são colocadas individualmente sobre o alimento e seu desenvolvimento é acompanhado até a emergência, dentro de estufa BOD (BARBOSA et al., 2015; ROSA et al., 2016; BERNARDES et al., 2018;

ARAUJO et al., 2019; DORNELES et al., 2021).

Quando as abelhas emergem, são realizadas as análises de morfologia externa, em que os indivíduos são fotografados em microscópio estereoscópico com câmera acoplada e medidas como largura da cabeça, distância intertegular e nervuras das asas são registradas. Neste último caso, as asas são retiradas e colocadas em lâminas de microscopia para análise (ROSA et al., 2016).

Barbosa et al. (2015), ao analisarem operárias da espécie *M. quadrifasciata* expostas a azadiractina e espinosade durante o período larval, relataram que pupas expostas aos dois tipos de inseticidas apresentavam apêndices malformados (asas contorcidas, pernas e antenas contorcidas) e conseqüentemente, desenvolviam-se em adultos com deformações, massa corporal reduzida e alteração no padrão de coloração do corpo.

Em *Scaptotrigona depilis* (Moure, 1942) expostas durante o estágio larval à dose de campo do tiametoxam e doses próximas a esta, apresentaram a largura da cabeça e do espaço intertegular com valores inferiores àqueles encontrados em abelhas não expostas. Em doses mais altas, os indivíduos que emergiram foram menores e assimétricos (ROSA et al., 2016).

Quando operárias de *P. helleri* tratadas com azadiractina durante o período larval emergiram, apresentaram deformações nas antenas, mandíbulas, pernas e asas contorcidas; que se agravaram proporcionalmente ao aumento da concentração de exposição. Ainda, a maioria das pupas com deformações, quando se tornaram adultas, não foram capazes de caminhar ou se alimentar (BERNARDES et al., 2018). De acordo com Dorneles et al. (2021), a exposição ao inseticida clorpirifós durante o período larval, resultou em

redução na distância intertegular de adultos recém emergidos, além de apêndices (pernas e antenas) com deformações.

As alterações na morfologia externa de abelhas sociais expostas a diferentes tipos de agrotóxicos, comprometem suas atividades na colônia, uma vez que podem interferir na locomoção, atividade de forrageio, alimentação, comunicação e percepção olfatória (WU et al., 2011; BARBOSA et al., 2015).

### 3.2.2 Análises Bioquímicas

#### 3.2.2.1 Enzimas

Diversas enzimas têm sido usadas como indicadores ou biomarcadores relacionados aos efeitos de agrotóxicos, como a Acetilcolinesterase (AChE), a Carboxilesterase (CaE), a Glutathione S-Transferase (GST) e outras envolvidas com sistemas oxidativos, como a Catalase (CAT), a Glutathione Peroxidase (GPX) e a Superóxido dismutase (SOD). A análise de tais enzimas pode indicar as respostas celulares de um possível processo de estresse oxidativo gerado em abelhas expostas à agrotóxicos, com geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) levando à oxidação de biomoléculas e causando potencial dano oxidativo em células e tecidos (BARBOSA et al., 2010).

A enzima AChE é responsável por mediar a transmissão do impulso nervoso, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina em sinapses colinérgicas (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012). As CaEs estão envolvidas em diversos processos metabólicos, auxiliam no processo de desintoxicação e catalisam a hidrólise ligações éster carboxílico, pela adição de água (YAN et al., 2009). A GST desempenha um papel fundamental no processo de detoxificação celular e correção dos efeitos deletérios de compostos xenobióticos (BADIOU-

BÉNÉTEAU et al., 2012). As enzimas antioxidantes CAT, SOD e a GPX atuam por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

Para a análise enzimática, partes do corpo da abelha, como a cabeça tórax e/ou abdômen, são dissecados e homogeneizados em solução e passam por diferentes procedimentos, que variam de acordo com as enzimas a serem analisadas (DINIZ et al., 2020a; FARDER-GOMES et al., 2021a; FARDER-GOMES et al., 2021b; PEREIRA et al., 2021). Em alguns estudos, é realizado o procedimento de eletroforese para a análise da atividade enzimática (MOREIRA et al., 2018; DINIZ et al., 2020a; PEREIRA et al., 2021), em outros, a atividade é analisada em espectrofotômetro (CHIBEE et al., 2021; FARDER-GOMES et al., 2021a; FARDER-GOMES et al., 2021b).

Ao avaliar a ação enzimática em abelhas *S. bipunctata* tratadas com o inseticida cipermetrina, Pereira et al. (2021) observaram que as esterases apresentaram diferentes padrões de expressão. As esterases estão frequentemente envolvidas na resistência de insetos a organofosforados, carbamatos, e piretroides através de uma combinação de mecanismos para desintoxicar o organismo inseto (LI et al., 2007).

No estudo de Chibee et al. (2021), observou-se que em abelhas *Meliponula bocandei* (Spinola 1853) expostas oralmente à cipermetrina, houve inibição significativa na atividade da SOD, o que pode estar relacionado com a produção em excesso de EROs (CHIBEE et al., 2021). Houve ainda, em abelhas expostas de forma oral e por contato, a indução de CAT, possivelmente relacionada à conversão de EROs em água (CHIBEE et al., 2021).

As enzimas CAT, SOD e GST apresentaram aumento na atividade, em corpos de abelhas da espécie *P. helleri* expostas ao fipronil, o que sugere a ativação de um mecanismo de desintoxicação contra o estresse oxidativo induzido pelo inseticida utilizado (FARDER-GOMES et al., 2021a). Em outro trabalho com a mesma espécie, porém com o estudo da parte cerebral de abelhas expostas, a atividade da CAT diminuiu em abelhas expostas, enquanto a atividade da GST aumentou, indicando a ativação de uma resposta protetora para neutralizar os efeitos do estresse oxidativo gerado pelo fipronil (FARDER-GOMES et al., 2021b).

#### 3.2.2.2 Ensaio cometa

O ensaio cometa é uma técnica capaz de medir danos genotóxicos; e tem sido usada em diversos grupos de insetos (BERTOLI, 2020). Esta metodologia avalia e quantifica danos no material genético de células individuais, a partir da eletroforese do DNA (COLLINS, 2014; BERTOLI, 2020).

Nesta técnica, as amostras celulares são incorporadas em gel de agarose, seguido por um tratamento com solução de lise, para a remoção da membrana plasmática e proteínas. Dessa forma, mantém-se apenas a cromatina nuclear incorporada ao gel. As amostras de material genético são submetidas a um tratamento alcalino e à eletroforese e os resultados podem ser observados em microscópio de fluorescência. O material genético pouco fragmentado permanece com a cromatina condensada; e os fragmentos migram em direção ao ânodo, fazendo com que se forme uma cauda (“cometa”), a qual varia em tamanho, de acordo com o grau do dano ocorrido (COLLINS, 2014).

Estudos com abelhas do gênero *Apis* mostraram que indivíduos expostos a agrotóxicos apresentaram maior fragmentação no material genético, em relação aos não expostos (HAYAT et al., 2018; VILLAR e OJEDA, 2019). Apesar de revelarem resultados importantes de toxicidade, estudos que utilizam a metodologia do ensaio cometa para a avaliação de danos de agrotóxicos em abelhas são pouco frequentes. Até o momento, um único estudo foi publicado utilizando esta técnica em abelhas-sem-ferrão, da espécie *M. quadrifasciata*, as quais foram expostas ao imidacloprido. Porém, neste caso, não foram encontradas diferenças no DNA extraído de hemócitos, de operárias expostas e não-expostas ao produto (BRITO et al., 2020).

São poucos os estudos que utilizam esta técnica, na avaliação de danos genotóxicos de agrotóxicos em abelhas, principalmente as sem ferrão. Dessa forma, tais estudos são necessários, devido à relevância econômica e ecológica das abelhas nativas. Além disso, o ensaio cometa tem se mostrado efetivo na avaliação de danos genotóxicos em outras espécies de abelhas (HAYAT et al., 2018; VILLAR e OJEDA, 2019).

### 3.2.3 Análises Fisiológicas

#### 3.2.3.1 Taxa respiratória

Através dos padrões das trocas gasosas, métodos para a análise da taxa respiratória têm sido utilizados na determinação de efeitos tóxicos subletais de muitos produtos químicos (KARISE et al., 2018). Esta análise envolve a utilização de um respirômetro equipado com analisador de CO<sub>2</sub>. Grupos de abelhas são introduzidos em uma câmara de vidro, completamente fechada e a produção de CO<sub>2</sub> é determinada após a injeção de ar livre de CO<sub>2</sub>

na câmara, por determinado período de tempo. A corrente de ar direciona o CO<sub>2</sub> produzido pelas abelhas para um leitor infravermelho conectado ao sistema (TOMÉ et al., 2015a; BERNARDES et al., 2017; BOTINA et al., 2019; MARQUES et al., 2020; ALMEIDA et al., 2021).

Operárias de *M. quadrifasciata* foram expostas oralmente ao espinosade e imidacloprido e apresentaram alteração na taxa respiratória após a exposição aos dois tipos de agrotóxicos. A taxa respiratória foi menor após 3h de exposição ao imidacloprido, em comparação com àquelas expostas ao espinosade e as do grupo controle. Por outro lado, houve aumento na taxa respiratória de abelhas tratadas com imidacloprido, entre 3h e 24h. Para o espinosade, houve redução entre 3h e 24h de exposição. Tais alterações provavelmente interferiam nas atividades de voo, também avaliadas no estudo (TOMÉ et al., 2015a). Em *P. helleri*, expostas a doses subletais do imidacloprido e à uma mistura de fungicidas (clorotalonil e tiofanato-metilico) houve redução na taxa respiratória, conforme o aumento da concentração dos produtos (ALMEIDA et al., 2021).

A taxa respiratória é um indicador de estresse fisiológico; e os agrotóxicos podem comprometer a respiração dos insetos (TOMÉ et al., 2015a; ALMEIDA et al., 2021). Além disso, a alteração na taxa respiratória, pode ocorrer de forma associada a outros efeitos subletais causados por agrotóxicos, levando a prejuízos na saúde da colônia como um todo.

### 3.2.3.2 Tempo de desenvolvimento e massa corporal

Abelhas expostas a diferentes tipos de agrotóxicos durante a fase larval, podem ser avaliadas quanto a possíveis alterações no tempo de

desenvolvimento larval e de pupação. Nestas análises, após a a preparação do alimento contaminado com agrotóxico e colocação das larvas sob o alimento, em microplacas (como descrito no tópico 3.1), os indivíduos são monitorados diariamente durante todo o período de desenvolvimento, até a emergência dos adultos (ARAUJO et al., 2019). A massa corporal é medida ao longo do tempo de desenvolvimento.

A duração do tempo de desenvolvimento de larvas de *P. droryana* foi afetada pela exposição ao clorpirifós, com rainhas expostas apresentando atraso no tempo de desenvolvimento (SANTOS et al., 2016). Houve aceleração no tempo de desenvolvimento larval e atraso no desenvolvimento de pupas de *S. depilis* expostas a doses de campo realistas, do tiametoxam (ROSA et al., 2016).

A ingestão de doses subletais do espinosade afetou significativamente o tempo de pupação de abelhas da espécie *P. helleri*, com aumento no tempo de desenvolvimento de indivíduos tratados (ARAUJO et al., 2019).

Larvas de *M. quadrifasciata* tratadas com espinosade e azadiractina resultaram em pupas com massa corporal significativamente reduzida (BARBOSA et al., 2015). A exposição ao clorpirifós durante a fase larval de *S. bipunctata* reduziu a massa corporal de adultos recém emergidos, com abelhas expostas sendo 21% mais leves, em relação ao grupo controle, o que pode estar relacionado ao aumento do metabolismo em resposta aos mecanismos de detoxificação (DORNELES et al., 2021).

A divisão de trabalho em abelhas sociais é determinada pelo polietismo etário, que é a transição de tarefas com o passar da idade, dentro de uma colônia (SEELEY, 1982; JOHNSON, 2005). O atraso no desenvolvimento larval

e massa corporal podem ser fatores que alteraram o comportamento dos indivíduos expostos, causando prejuízos no desempenho dos indivíduos após emergirem (quando não causa a mortalidade antes de chegar à esta fase) (SANTOS et al., 2016; BERNARDES et al., 2018; ARAUJO et al., 2019).

### 3.2.4 Análises Comportamentais

#### 3.2.4.1 Reflexo de extensão da probóscide (REP)

A aprendizagem associativa é um importante componente no comportamento de forrageamento das abelhas (GIL e DE MARCO, 2005). A exposição à agrotóxicos pode afetar a resposta condicionada das abelhas, levando a redução na capacidade de detecção de odores florais e associação com as recompensas (néctar, pólen etc.) (FREITAS e PINHEIRO, 2012).

O teste de Reflexo de Extensão da Probóscide (REP) é um método utilizado na análise de efeitos de agrotóxicos em abelhas, o qual avalia o aprendizado de abelhas a partir de um estímulo olfatório. Tal condicionamento é muito utilizado na análise de aspectos da capacidade olfativa, aprendizagem e formação da memória nos insetos (GIL e DE MARCO, 2005; FERNANDES, 2012).

Neste método, as abelhas são previamente anestesiadas e colocadas em um suporte com a cabeça e antenas livres para o teste. As antenas são tocadas com solução de sacarose a crescentes concentrações. A extensão completa da probóscide após o toque na antena é considerada uma resposta positiva ao estímulo. Dessa forma, pode-se avaliar os efeitos do agrotóxico na resposta gustativa das abelhas expostas (LAMBIN et al., 2001; SILVA et al., 2016; CHIBEE et al, 2021; SOUZA, 2021).

A exposição oral ao imidacloprido comprometeu o REP de operárias de *S. postica*, já que houve diminuição nas respostas de REP de abelhas expostas (SILVA et al., 2016). O REP de abelhas da espécie *M. bocandei* também foi prejudicado quando estas foram expostas a cipermetrina. Apesar dos efeitos apresentados, os resultados para espécies nativas sem ferrão são pouco expressivos, devido à falta de estudos que usam essa metodologia neste grupo de abelhas (CHIBEE et al., 2021).

São mais frequentes os estudos com REP em abelhas da espécie *Apis mellifera* L. Estes estudos mostram o REP como um método eficaz na avaliação da aprendizagem relacionada a mecanismos neurais, permitindo a identificação dos elementos das vias olfativas e das respostas compensatórias no cérebro das abelhas (LAMBIN et al., 2001; DECOURTYE et al., 2003).

#### 3.2.4.2 Preferência por cores

A análise da preferência por cores, visa investigar se os agrotóxicos podem causar alterações na discriminação de cores pelas abelhas, o que pode causar diversas implicações. Esta metodologia é feita através da utilização de um tubo de vidro em forma de “T”, com os dois braços laterais revestidos com papel celofane, a fim de filtrar a luz amarela ou azul, que foram selecionadas por serem espectralmente distintas para as abelhas. Os tubos são colocados em sala escura, em uma base preta contendo diodos emissores de luz. As abelhas são soltas individualmente na entrada do braço principal do tubo e a preferência dos indivíduos pela cor (amarela ou azul) é registrada (ALMEIDA et al., 2021).

Até o momento, apenas o estudo de Almeida et al., (2021) utilizou esta

metodologia por um período de doze meses (a fim de avaliar a preferência ao longo do ano), em uma espécie de abelha sem ferrão. Este trabalho mostrou que mesmo na concentração subletal mais baixa do imidacloprido, indivíduos de *P. helleri* reduziram significativamente a preferência pela cor amarela.

Além disso, tanto o imidacloprido, quando a mistura de fungicidas tiofanato-metil e clorotalonil alteram a habilidade das abelhas na discriminação entre amarelo e azul. As alterações na preferência por cores podem revelar importantes impactos na capacidade de discriminar comprimentos de onda ou prejudicar sua aprendizagem adaptativa e interação e comunicação, interferindo na saúde da colônia (ALMEIDA et al., 2021).

#### 3.2.4.3 Alimentação

Os efeitos de agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão, podem ser avaliados quanto à preferência ou rejeição das abelhas, pelo alimento contaminado com esses produtos. Assim, é possível avaliar a capacidade da abelha na percepção do alimento contaminado.

Para as análises, as abelhas são colocadas dentro de uma arena (pote plástico com tampa) contendo simuladores florais feitos com papel cartão, os quais são colocados na parte superior da arena. Um canudo de acrílico é inserido até o interior do frasco, onde a dieta é colocada. As abelhas são colocadas no interior da arena e seu comportamento é observado por determinado período de tempo (COSTA et al., 2020).

Abelhas da espécie *M. quadrifasciata anthidioides* não manifestaram rejeição ao alimento contaminado por imidacloprido, mesmo quando expostas à alta concentração do inseticida (20%) (COSTA et al., 2020). Em *Plebeia*

*moureana* não houve rejeição ao alimento misturado com a concentração recomendada do espinosade (SÁNCHEZ et al., 2012).

Dessa forma, os estudos apontam para a não-rejeição a dietas contaminadas com agrotóxicos, por forrageiras de abelhas-sem-ferrão. Assim, a exposição a agrotóxicos pode levar a efeitos subletais nesses indivíduos, prejudicando seu comportamento e podendo afetar toda a colônia, através da deposição do alimento contaminado nos potes de alimento do interior do ninho (SÁNCHEZ et al., 2012).

No estudo de Santos et al. (2016), abelhas da espécie *P. droryana* foram expostas durante o período larval, ao alimento contaminado com clorpirifós. O alimento larval fornecido era suficiente para produzir apenas rainhas (o que foi observado no grupo controle), entretanto, no grupo exposto, houve o desenvolvimento de operárias. Tal resultado indica que as abelhas que emergiram como operárias consumiram menos alimento larval, o que as impediu de adquirir atributos de rainha.

#### 3.2.4.4 Comunicação/interação

O comportamento social é extremamente importante na comunicação de indivíduos que dividem uma colmeia, como as abelhas eussocias (MICHENER, 2007) e a análise desse comportamento possibilita a avaliação da interferência dos agrotóxicos na comunicação entre indivíduos da mesma colônia. Nesta análise, as abelhas são analisadas em pequenos grupos (três indivíduos), os quais são previamente individualizados para que apenas um indivíduo entre em contato com o agrotóxico por meio de alimento. Após o consumo, os indivíduos são marcados e colocados juntos em placa de Petri com tampa. Dessa forma,

pode-se observar o comportamento social e interação entre as abelhas, como eventos de vibração de asas, antenações (movimentos com as antenas a fim de distinguir fêmeas aparentadas de não aparentadas) e trofalaxia (transferência direta de alimentos entre operárias) (SILVA et al., 2017; BOFF et al., 2018).

O número de antenações e trofalaxia foi menor em *M. quadrifasciata*, tratadas com os inseticidas combinados acetamiprido e alfa-cipermetrina, do que em abelhas não tratadas. Além disso, o número de interações diminuiu, com o passar do tempo de exposição (SILVA et al., 2017). O mesmo resultado foi observado quando operárias da mesma espécie foram expostas ao mesmo produto: o número de interações sociais (antenação e trofalaxia) reduziu significativamente em *M. quadrifasciata* (BOFF et al., 2018).

Abelhas da espécie *Nannotrigona testaceicornis* (Lepeletier, 1836) expostas a deltametrina, apresentaram aumento significativo no número médio de eventos de autolimpeza. Além disso indivíduos expostos a deltametrina, imidacloprido e espinetoram, exibiram aumento no número médio de comportamentos ventilatórios e redução no número médio de antenações, em comparação com o grupo de controle (MATOS et al., 2021).

O imidacloprido deprimiu a atividade em grupo de *M. quadrifasciata* logo após a exposição, com um aumento subsequente e atividade geral do grupo tratado, quase cinco vezes acima dos níveis normais (controle), após 24 horas de exposição (TOMÉ et al., 2015a). O mesmo produto, quando exposto em rainhas de *Plebeia droryana* (Friese, 1900) durante o período larval, provocou resultados significativos na alteração do comportamento de vibração das asas, trofalaxia e comportamento de perseguição. Mesmo quando houve antenação

por parte dos indivíduos tratados, este comportamento não foi correspondido com trofalaxia pelas operárias (OTESBELGUE et al., 2018).

Em *M. quadrifasciata anthidioides* expostas de forma oral ao imidacloprido, houve redução no número de antenações, em relação ao grupo controle (COSTA et al., 2020). Operárias da espécie *P. helleri* expostas a baixas concentrações de imidacloprido apresentaram diminuição acentuada na atividade de grupo. Porém, quando as abelhas foram expostas a uma mistura de fungicidas (clorotalonil + tiofanato metílico), um efeito contrário foi notado (ALMEIDA et al., 2021).

Abelhas expostas a diferentes agrotóxicos, apresentaram seu comportamento social alterado, o que mostra a relevância dessa metodologia para esse grupo de abelhas. Isso porque, esses indivíduos possuem um refinado sistema de comunicação (MICHENER, 2007) e abelhas expostas a agrotóxicos podem não ser reconhecida pelas abelhas não expostas (SILVA et al., 2017), o que pode prejudicar a comunicação e reconhecimento de indivíduos, dentro da colônia.

#### 3.2.4.5 Locomoção

##### 3.2.4.5.1 Locomoção em arena

Esta metodologia avalia a locomoção e movimentação das abelhas em uma arena composta por placa de Petri, com fundo forrado com papel filtro. As abelhas são colocadas individualmente na arena e seu comportamento é filmado por tempo determinado e analisado posteriormente (TOMÉ et al., 2012; BARBOSA et al., 2015; BERNARDES et al., 2017; BERNARDES et al., 2018; BOTINA et al., 2019; JACOB et al., 2019; MARQUES et al., 2020; FARDER-

GOMES et al., 2021b). Com esta metodologia é possível avaliar a distância e velocidade média de caminhada, o tempo e o número de vezes em que os indivíduos ficaram parados na arena

O comportamento de caminhada de operárias de *M. quadrifasciata* recém emergidas tratadas com espinosade, dependeu da idade e da dose do inseticida. Com o aumento da idade (em dias), houve diminuição no número de paradas e no tempo de descanso, porém, a distância caminhada e na velocidade aumentaram (BARBOSA et al., 2015). Um comportamento similar, de aumento significativo na distância caminhada e na velocidade, também foi observado em operárias de *P. helleri* tratadas com fipronil (FARDER-GOMES et al., 2021b).

Por outro lado, para abelhas recém emergidas de *M. quadrifasciata anthidioides*, tratadas com imidacloprido durante a fase larval, foi observado que doses maiores levaram à diminuição da distância caminhada e da velocidade, além do aumento no tempo de descanso e no número de paradas na arena (TOMÉ et al., 2012). A redução na distância percorrida também foi constatada em *M. quadrifasciata* expostas ao mesmo inseticida. Neste último caso, o efeito pode estar associado à redução do consumo alimentar, que também foi avaliada neste estudo, sugerindo uma dificuldade de controle motor causada pelo inseticida (BRITO et al., 2020). Este inseticida pode ter efeito direto nos neurônios motores, comprometendo, dessa forma, a atividade motora (TOMÉ et al., 2012).

Jacob et al. (2019), ao estudarem o efeito de quatro tipos de neonicotinoides (acetamiprido, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam), em operárias de *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) observaram que todos os

agrotóxicos testados causaram mudanças no comportamento das abelhas, variando em nível de efeito, de acordo com o ingrediente ativo. Por exemplo, a exposição ao tiametoxam causou hiperatividade, com aumento na velocidade e distância percorrida. Por outro lado, em indivíduos expostos ao imidacloprido, tiacloprido e acetamiprido houve redução na distância percorrida.

A locomoção de operárias da espécie *Plebeia lucii* Moure, 2004 foi prejudicada após a ingestão de doses crescentes de espinosade (MARQUES et al., 2020). Operárias de *P. helleri* tratadas oralmente com a CL<sub>50</sub> da mistura de herbicidas mesotriona e atrazina, também apresentaram menor taxa de caminhada em relação ao grupo controle (ARAÚJO et al., 2020).

#### 3.2.4.5.2 Locomoção em caixa de madeira

Assim como o teste de locomoção em arena citado anteriormente, a metodologia do teste de locomoção em caixa de madeira também avalia os efeitos de agrotóxicos na atividade locomotora e orientação, acarretando dificuldades no comportamento de forrageio das abelhas (LOURENÇO, 2012; SILVA et al., 2016; SOUZA, 2021).

Nesse teste, os indivíduos são colocados no interior de uma caixa (geralmente de madeira), medindo aproximadamente 80 cm x 30 cm x 4 cm. Esta é posicionada verticalmente e contém uma luz na parte superior, para estimular a subida ou escada das abelhas, devido à sua fototaxia positiva (LOURENÇO, 2012; SILVA et al., 2016; MORAIS et al., 2018; FERREIRA et al., 2020; SOUZA, 2021).

Uma tela é colocada alguns centímetros abaixo da lâmpada, para evitar que as abelhas a alcancem (LOURENÇO, 2012; SOUZA, 2021). A atividade

locomotora dos indivíduos é medida pelo tempo em que demoram para alcançar determinado ponto da caixa (50 cm, na maioria dos casos). O comportamento das abelhas é filmado e depois, analisado com auxílio de *software* (LOURENÇO, 2012; SILVA et al., 2016; MORAIS et al., 2018; SOUZA, 2021).

No estudo de Lourenço (2012) observou-se que a capacidade locomotora e orientação de *M. scutellaris* foi diminuída, em indivíduos expostos oral e topicamente ao inseticida fipronil. Além disso, houve maior porcentagem de abelhas que não conseguiram iniciar e/ou completar o percurso na caixa de locomoção. Em estudo semelhante, com a mesma espécie de abelha e tipo de inseticida, Moraes et al. (2018) constataram redução na velocidade de abelhas expostas. Houve também diminuição na velocidade média (centímetros/segundos), quando abelhas da espécie *S. postica* foram expostas ao imidacloprido (SILVA et al., 2016).

Operárias das espécies *M. quadrifasciata* e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) apresentaram diferentes comportamentos nos testes de locomoção, quando tratadas com diferentes tipos de agrotóxicos (tiametoxam, espinetoram, novaluron e abamectina), mostrando que a toxicidade varia de acordo com o mecanismo de ação de cada inseticida e a espécie. Entretanto, o inseticida tiametoxam foi o mais tóxico para ambas as espécies estudadas (PIOVESAN et al., 2020).

Indivíduos da espécie *Scaptotrigona xanthotricha* Moure, 1950 tratados com acetamiprido, levaram mais tempo de execução da atividade de locomoção, do que abelhas não tratadas (grupo controle) (FERREIRA et al., 2020). Por outro lado, abelhas da mesma espécie quando tratadas com o

herbicida glifosato, apresentaram aumento na velocidade/atividade locomotora, o que também pode interferir nas atividades de forrageio e promover movimentos desordenados (SOUZA, 2021).

A metodologia para análise dos efeitos de agrotóxicos através de locomoção em caixa de madeira, citada acima, assim como a metodologia de locomoção em arenas, mostraram que os efeitos na orientação e atividade locomotora as abelhas, podem variar de acordo com o tipo de agrotóxico e espécie de abelha testada. Por exemplo, alguns produtos causaram aumento na distância caminhada, enquanto outros, provocaram o efeito contrário. Estes resultados mostram a relevância dessa análise, já que, se o comportamento de locomoção estiver comprometido, é provável que seus comportamentos subsequentes de voo e forrageamento sejam também prejudicados (TOMÉ et al., 2012; FARDER-GOMES et al., 2021b), além das atividades internas da colônia, como estoque de comida e alimentação das larvas (TOMÉ et al., 2012).

#### 3.2.4.6 Voo

A capacidade de voo é outra forma de analisar os efeitos subletais de indivíduos expostos à agrotóxicos e tem o objetivo de verificar se esses produtos, implicam nos comportamentos relacionados à atividade de forrageio das abelhas.

A metodologia consiste em uma torre de caixa de madeira de aproximadamente 1 metro de altura, contendo uma lâmpada fluorescente acoplada a 5 cm acima da torre. O experimento é realizado em sala escura, para a atração das abelhas para a lâmpada. Após a exposição ao agrotóxico,

as abelhas são colocadas individualmente no fundo da torre de madeira e sua atividade de voo é filmada e acompanhada por tempo determinado (TOMÉ et al., 2015a; TOMÉ et al., 2015b; BERNARDES et al., 2017; BOTINA et al., 2019; MARQUES et al., 2020).

Operárias de *M. quadrifasciata* apresentaram alterações na atividade de voo quando expostas aos inseticidas imidacloprido e espinosade. A atividade de voo foi mais comprometida em indivíduos expostos ao imidacloprido, os quais não alcançaram altura maior do que 35 cm (TOMÉ et al. 2015a). Abelhas da espécie *P. lucii* expostas ao espinosade também não foram capazes de atingir a parte mais alta da caixa e manifestaram alterações na atividade de voo, em comparação ao grupo não tratado (MARQUES et al., 2020).

No estudo de Tomé et al. (2015b), observou-se que a decolagem de voo de duas espécies, *P. helleri* e *S. xanthotricha*, foi prejudicada pela azadiractina e clorantraniliprole, dependendo do tipo de exposição a esses agrotóxicos. O fungicida mancozeb e o inseticida tiametoxam, mesmo em doses mais baixas, afetaram significativamente a capacidade de voo de *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994 expostas por contato, já que grande parte dos indivíduos expostos ficou na base da torre de voo. A dose de campo do glifosato, quando aplicada oralmente, causou o mesmo efeito (GOMES, 2017).

Os testes que avaliam possíveis efeitos prejudiciais de agrotóxicos na capacidade de voo das abelhas são relevantes, pois a alteração no comportamento de voo, em campo, pode ser altamente prejudicial para as atividades de polinização, resultando em prejuízos para toda a colônia (TOMÉ et al. 2015b; MARQUES et al., 2020).

#### 3.2.4.7 Outros efeitos no comportamento

Alguns estudos relatam também a observação de outros efeitos subletais no comportamento de abelhas tratadas, como: prostração, paralisia, tremores (SOARES et al., 2015), letargia, dificuldade motora, desorientação (MORAIS et al., 2018; NOCELLI, et al., 2019), hiperexcitação (LOURENÇO et al., 2012; MORAIS et al., 2018) e autolimpeza (LEITE et al., 2021). Movimentos das asas, vibração e movimentos circulares também podem ser observados em abelhas expostas a agrotóxicos (QUIROGA-MURCIA et al., 2017).

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os estudos toxicológicos avaliando os efeitos subletais de agrotóxicos como inseticidas, herbicidas, fungicidas e acaricidas, realizados até o momento, têm utilizado uma gama ampla de análises para avaliar alterações fisiológicas, morfológicas, genéticas, bioquímicas e comportamentais em abelhas-sem-ferrão. Os resultados destes estudos têm revelado que mesmo em doses/concentrações subletais os diferentes grupos químicos de agrotóxicos utilizados nas lavouras, provocam danos significativos nos organismos expostos durante a fase larval e adulta. Apesar de, em alguns casos, esses produtos não causarem a morte imediata das abelhas logo após a exposição, os efeitos subletais provocados pelos agrotóxicos podem gerar uma série de efeitos negativos nas abelhas expostas. Foram relatadas alterações fisiológicas, genéticas e bioquímicas, comprometimento das atividades de voo, locomoção e interação social, além de mudanças na morfologia externa e interna, de abelhas-sem-ferrão expostas aos agrotóxicos.

Dessa forma, o presente estudo ressalta a relevância da avaliação dos

efeitos subletais provocados por agrotóxicos em abelhas-sem-ferrão, devido à sua importância como polinizadores de plantas nativas e cultivadas; e considerando a ameaça que estes insetos sofrem, com o uso intensivo de agrotóxicos nos últimos anos, principalmente no Brasil, onde grande parte das espécies de Meliponini ocorrem.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABRAHAM, J.; BENHOTONS, G. S.; KRAMPAH, I.; et al. Commercially formulated glyphosate can kill non-target pollinator bees under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis**, v.166, p.695-702, 2018. <https://doi.org/10.1111/eea.12694>

ALMEIDA, C. H. S.; HADDI, K.; TOLEDO, P. F. S.; et al. 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, 146432, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146432>

ARAUJO, R. dos S., BERNARDES, R. C., FERNANDES, K. M.; et al. Spinosad-mediated effects in the post-embryonic development of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Environmental Pollution**, v.253, p.11-18, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.087>

ARAÚJO, R. dos S.; BERNARDES, R. C.; MARTINS, G. F. A mixture containing the herbicides Mesotrione and Atrazine imposes toxicological effects on workers of *Partamona helleri* (Friese, 1900). **Science of the Total Environment**, v.763, 142980, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142980>

AZEVEDO, P.; NOCELLI, R. C. F. Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. **Revista da Biologia**, v.1, p.10-20, 2020. <https://doi.org/10.7594/revbio.20.01.10>

BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; et al. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environment Safety**, v.82, p.22–31, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.05.005>

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B, ALFENAS, R. C. G.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.:629-643, 2010. <https://doi.org/10.1159/000320546>

BARBOSA, W. F.; SMAGGHE, G.; GUEDES, R. N. Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. **Pest Management Science**, v.71, n.8, p.1049-1053, 2015. <https://doi.org/10.1002/ps.4025>

BERNARDES, R. C.; TOMÉ, H. V. V.; BARBOSA, W. F.; et al. Azadirachtin-induced antifeeding in Neotropical stingless bees. **Apidologie**, v.48, p.275-285, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0473-3>

BERNARDES, R. C.; BARBOSA, W. F.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A. P. The reduced-risk insecticide azadirachtin poses a toxicological hazard to stingless bee *Partamona helleri* (Friese, 1900) queens. **Chemosphere**, v.201, p.550-556, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.030>

BERTOLI, L. C. Padronização e aplicação do ensaio cometa para análise de genotoxicidade do mercúrio em abelhas da espécie *Bombus atratus* (Hymenoptera, Bombini). **Dissertação de Mestrado**. 124f. Sorocaba, SP. 2020.

BOFF, S.; FRIEDEL, A.; MUSSURY, R. M.; et al. Changes in social behavior are induced by pesticide ingestion in a Neotropical stingless bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.164, p.548-553, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.061>

BOTINA, L. L.; VÉLEZ, M.; BARBOSA, W. F.; et al. M. Behavior and gut bacteria of *Partamona helleri* under sublethal exposure to a bioinsecticide and leaf fertilizer. **Chemosphere**, v.234, p.187-195, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.048>

BRIGANTE, J.; COSTA, J. O.; ESPÍNDOLA, E. L.; DAAM, M. A. Acute toxicity of the insecticide abamectin and the fungicide difenoconazole (individually and in mixture) to the tropical stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology**, v.30, p.1872-1879. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02458-7>

BRITO, P.; ELIAS, M.; SILVA-NETO, C.; et al. 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. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08530-9>

CHIBEE, G. U.; OJELABI, M. O.; FAJANA, H. O.; et al. Effects of cypermethrin as a model chemical on life cycle and biochemical responses of the tropical stingless bee *Meliponula bocandei* Spinola, 1853. **Environmental Advances**, v.5, 100074. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100074>

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, p.794-800, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.022>

COSTA L. M.; GRELLA, T. C., BARBOSA, R. A.; et al. Determination of acute lethal doses (LD<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub>) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v.62, n.4, p.578-582, 2015. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.792>

COSTA, L. G. L.; BARCHUCK, A. R.; TEIXIERA, I. R. V. Efeitos do neonicotinoide imidacloprido no comportamento alimentar de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. **Revista Agrogeoambiental**, v.22, n.1, p.143-153, 2020. <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v12n120201411>

COX, D. W. Disorders of copper transport. **British Medical Bulletin**, v.55, p.544–555, 1999. <https://doi.org/10.1258/0007142991902619>

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: Morfologia e função de sistemas**. 1a ed. UNESP, Rio Claro, 2009.

DECOURTYE, A.; LACASSIE, E.; PHAM-DELÈGUE, M. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L.) are differentially affected by imidacloprid according to the season. **Pest Management Science**, v.59, p.269-278, 2003. <https://doi.org/10.1002/ps.631>

DEL-SARTO, M. C.; OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. C.; CAMPOS, L. A. O. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona*

*quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v.45, n.5, p.1-11, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0281-6>

DINIZ, T. O.; PEREIRA, N. C.; PIZZAIA, W. C. S.; et al. Toxicity and genetic analysis of bees *Scaptotrigona bipunctata* after contamination with insecticide acephate. **Scientific Electronic Archives**, v.13, n.8, p.8-17, 2020a. <https://doi.org/10.36560/13820201157>

DINIZ, T. O.; PEREIRA, N. C.; SILVA, B. G.; et al. Toxicity and effects of combined agrochemical in *Scaptotrigona bipunctata* bees. **Scientific Electronic Archives**, v.13, n. 12, p.41-53, 2020b. <http://dx.doi.org/10.36560/131220201258>

DORIGO, A. S., ROSA-FONTANA, A. S., SOARES-LIMA, H. M.; et al. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLoS One**, v.14, n.3, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213109>

DORNELES, A. L.; ROSA, A. S.; BLOCHTEIN, B. Toxicity of organophosphorus pesticides to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, v.48, p.612-620, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0502-x>

DORNELES, A. L.; ROSA-FONTANA, A. S., SANTOS, C. F.; BLOCHTEIN, B. Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. **Environmental Pollution**, v.272, 116414, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116414>

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review of Entomology**, v.51, p.203-232, 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150954>

FARDER-GOMES, C. F.; FERNANDES, K. M.; BERNARDES, R. C.; et al. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of Total Environment**, v.774, 145679,

2021a. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145679>

FARDER-GOMES, C. F.; FERNANDES, K. M., BERNARDES, R. C.; et al. Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini). **Science of Total Environment**, v.792, 148978, 2021b. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148678>

FERMINO, F.; FALCO, J. R.; TOLEDO, V. A. A.; et al. Isoenzymes and cytochemical analysis in *Tetragonisca angustula* and *Tetragonisca fiebrigi* after herbicide contamination. **Sociobiology**, v.58, n.2, p.353-366, 2011.

FERNANDES, R. O. Avaliação ecotoxicológica de agrotóxicos, seus componentes e afins: teste para o parâmetro abelhas. **Dissertação de Mestrado**. 42f. Viçosa, MG. 2012.

FERREIRA, R. A. C. Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. **Micron**, v.46, p.57-65, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.12.008>

FERREIRA, M. F. O; FRAGA, R.; BARROS, E. C.; AUGUSTO, S. C. Effects of abamectin and acetamiprid pesticides on the survival and behavior of *Scaptotrigona* aff. *xanthotricha* (Apidae, Meliponini). **Journal of Apicultural Research**, 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1835262>

FREITAS, B. M.; PINHEIRO, J. N. **Polinizadores e pesticidas: princípios de manejo para os agroecossistemas brasileiros**. Brasília: MMA. 112p. 2012.

GIL, M.; DE MARCO, R. J. Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. **The Journal of Experimental Biology**, v.208, p.671-680, 2004. <https://doi.org/10.1242/jeb.01474>

GOMES, I. N. Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* e *Apis mellifera*. **Dissertação de Mestrado**. 51f. Florestal, MG. 2017.

GÓMEZ-ESCOBAR, E.; LIEDO, P.; MONTOYA, P.; et al. Effect of GF-120 (Spinosad) aerial sprays on colonies of the stingless bee *Scaptotrigona mexicana* (Hymenoptera: Apidae) and the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v.111, n.4, p.1711-1715, 2018. <https://doi.org/10.1093/jee/toy152>

GRELLA, T. C. Efeitos de nanodoses do inseticida tiametoxam para a abelha *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae): da absorção ao órgão alvo. **Dissertação de Mestrado**. 60f. Araras, SP. 2017.

GRÜTER, C. **Stingless Bees - Their Behaviour, Ecology and Evolution**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2020.

HAYAT, K.; AFZAL, M.; AQUEEL, M. A.; et al. Insecticide exposure affects DNA and antioxidant enzymes activity in honey bee species *Apis florea* and *A. dorsata*: Evidence from Punjab, Pakistan. **Science of the Total Environment**, v. 635, p.1292-1301, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.221>

HEISENBERG, M. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learning & Memory**, v.5, p.1-10, 1998.

JACOB, C. R. O. Efeitos do inseticida fipronil sobre os corpos pedunculados de operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Dissertação de Mestrado**. 85f. Rio Claro, SP. 2012.

JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; CARVALHO, S. M.; et al. Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.90, p.69-72, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0892-4>

JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R.; MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science**, v.71, n.1, p.114-122, 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3776>

JACOB, C. R. O.; ZANARDI, O. Z.; MALAQUIAS, J. B.; et al. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille)

(Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v.224, p.65-70, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.105>

JOHNSON, B.R. Limited flexibility in the temporal caste system of the honey bee. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.58, p.219–226, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00265-005-0949-z>

KARISE, R.; RAIMETS, R.; DREYERSDOFF, G.; MAND, M. Using respiratory physiology techniques in assessments of pesticide effects on bees. **Julius-Kuhn-Archiv**, v.462, p. 61-66, 2018. <https://doi.org/10.5073/jka.2018.462.014>

LAMBIN, M.; ARMENGAUD, C.; RAYMOND, S.; GAUTHIER, M. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.48, p.129-134, 2001. <https://doi.org/10.1002/arch.1065>

LANDIM, C.C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo, Brasil: UNESP, 408p, 2009.

LEITE, D. T.; SAMPAIO, R. B.; CHAMBÓ, E. D.; et al. Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42690-021-00560-1>

LI, X.; SCHULER M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v.52, p.231-253, 2007. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151104>

LIMA, M. A. P.; MARTINS, G. F. OLIVEIRA, E. E.; GUEDES, R. N. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of Comparative Physiology A**, v.202, n.9-10, p. 733-747, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1110-3>

LOURENÇO, C. T. Determinação da toxicidade tópica e oral do inseticida fipronil e efeitos de suas doses subletais no comportamento de abelhas-sem-ferrão *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Dissertação de Mestrado**. 64f.

São Carlos, SP. 2012.

LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.89, p.921-924, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0773-x>

MACÍAS-MACÍAS, J. O.; TAPIA-RIVERA, J. C.; ALVARO D. L.; et al. *Nosema ceranae* causes cellular immunosuppression and interacts with thiamethoxam to increase mortality in the stingless bee *Melipona colimana*. **Scientific Reports**, v.10, 17021, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74209-3>

MARQUES, R. D.; LIMA, M. A. P.; MARQUES, R. D.; BERNARDES, R. C. A Spinosad-based formulation reduces the survival and alters the behavior of the stingless bee *Plebeia lucii*. **Neotropical Entomology**, v,29, p.578-585, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00766-x>

MATOS, W. B.; SANTOS, A. C. C.; LIMA, A. P. S.; et al. Potential source of ecofriendly insecticides: Essential oil induces avoidance and cause lower impairment on the activity of a stingless bee than organosynthetic insecticides, in laboratory. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 209, 111764. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111764>

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 2<sup>a</sup> ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 913 p, 2007.

MIOTELO, L.; REIS, A. L. M.; MALAQUIAS, J. B.; et al. *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, v.268, 115770, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115770>

MORAES, S. S.; BAUTISTA, A. R.; VIANA, B. F. Avaliação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de contato. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.29, n.1, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000100004>

MORAIS, C. R.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; CARVALHO, S. M.; et al.

Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). **Chemosphere**, v.206, 632-342. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.153>

MOREIRA, D. R.; GIGLIOLLI, A. A. S.; FALCO, J. R. P.; et al. Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v.33, n.4, p.463-475, 2018. <https://10.1002/tox.22533>

NASCIMENTO, J. C. Análise morfológica do trato digestório de abelhas-sem-ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille (1807) (1811) e *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) expostas ao tiametoxam. **Trabalho de Conclusão de Curso**. 20f. Rio Claro, SP. 2018.

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

OLIVEIRA, C. V. P.; GIGLIOLI, A. A. S.; GALHARDO, D.; et al. Effects of biopesticides in *Tetragonisca angustula* Latreille (Hymenoptera: Meliponinae) pollinators. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 23, n. 2, e2301, 2020. <https://doi.org/10.25110/argvet.v23i2cont.2020.8025>

OTESBELGUE, A.; SANTOS, C. F.; BLOCHTEIN, B. Queen bee acceptance under threat: Neurotoxic insecticides provoke deep damage in queen-worker relationships. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.166, p.42-47, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.048>

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

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

PEREIRA, A. M. Efeitos de inseticida na sobrevivência e no comportamento de abelhas. **Tese de Doutorado**. 124f. Rio Claro, SP. 2010.

PEREIRA, N. C.; DINIZ, T. O.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Sublethal effects of neonicotinoids in bees: a review. **Scientific Electronic Archives**, v.13, n.7, p.142-152, 2020. <https://doi.org/10.36560/13720201120>

PEREIRA, N. C.; DINIZ, T. O.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Toxicity and genetic analysis of *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 contaminated with the pyrethroid cypermethrin. **Scientific Electronic Archives**, v.14, n.1, p.59-66, 2021. <http://dx.doi.org/10.36560/14120211254>

PIOVESAN, B.; PADILHA, A. C.; MORAIS, M. C.; et al. Effects of insecticides used in strawberries on stingless bee *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v.27, n.34, p.42472-42480, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10191-7>

QUIROGA-MURCIA, D. E.; ZOTTI, M. J.; POLANÍA, I. Z.; PECH-PECH, E. E. Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). **Agronomía Colombiana**, v.35, n.3, p.340-349, 2017. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n3.65447>

RAHMAN, A. Chromatographic analysis of the insecticides thiamethoxam and imidacloprid on the stingless bee *Melipona scutellaris*: determination toxicity, and evaluation of the effects of biochemical markers. **Tese de Doutorado**. 11f. São Carlos, SP. 2020.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v.36, 71-83, 2005. <https://doi.org/10.1051/apido:2004071>

ROSA, A. S.; TEIXEIRA, J. S. G.; VOLLET-NETO, A.; et al. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. **Apidologie**, v.47, p.729-738, 2016. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0424-4>

SÁNCHEZ, D.; SOLÓRZANO, E. D. J.; LIEDO, P.; VANDAME, R. Effect of the natural pesticide spinosad (GF-120 formulation) on the foraging behavior of *Plebeia moureana* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v.105, n.4, p.1234-1237. <https://doi.org/10.1603/ec12047>

SANTOS, C. F.; ACOSTA, A. L.; DORNELES, A. L.; et al. Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. **Scientific Reports**, v.6, 31605, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep31605>

SEELEY, T.D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v.11, p.287-293, 1982. <https://doi.org/10.1007/BF00299306>

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. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.020>

SILVA, E. R. Doses subletais de pesticida (acetamiprido) não influenciam na sobrevivência mas afetam significativamente a comunicação da abelha *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini). **Trabalho de Conclusão de Curso**. 23f. Dourados, MS. 2017.

SILVA, M. B.; NOCELLI, R. C.; SOARES, H. M.; MALASPINA, O. Efeitos do imidacloprido sobre o comportamento das abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v.3, n.1, 2016.

SIVITER, H.; KORICHEVA, J.; BROWN, M. J.; LEADBEATER, E. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. **Journal of Applied Ecology**, v.5, p.2812-2821, 2018. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13193>

SOARES, H. M. Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas-sem-ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1897 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Dissertação de Mestrado**. 87p. Rio Claro, SP. 2012.

SOARES, H. M.; JACOB, C. R.; CARVALHO, S. M.; et al. Toxicity of

Imidacloprid to stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.94, n.6, p.675-680, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1488-6-6>

SOUZA, G. C. Efeitos de herbicidas na sobrevivência e comportamento de *Scaptotrigona aff. xanthotricha* (Apidae, Meliponini). **Dissertação de Mestrado**. 50p. Santarém, PA. 2021.

TOMÉ, H. V.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A.; et al. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PLoS One**, v.7, n.6, e38406, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038406>

TOMÉ, H. 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, p.103-109, 2015a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.038>

TOMÉ, H. V.; BARBOSA, W. F.; CORRÊA, A. S.; et al. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. **Annals of Applied Biology**, v.162, n.2, p.186-196, 2015b. <https://doi.org/10.1111/aab.12217>

TOMÉ, H. V. V.; RAMOS, G. S.; ARAÚJO, M, F.; et al. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **Royal Society Open Science**, v.4, n.1, 160866, 2017. <https://doi.org/10.1098/rsos.160866>

VIANA, T. A.; BARBOSA, W. F.; LOURENÇO, A. P.; et al. Changes in innate immune response and detoxification in *Melipona quadrifasciata* (Apinae: Meliponini) on oral exposure to azadirachtin and spinosad. **Apidologie**, v.52, p.252–261, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00814-w>

VILLAR, S.; OJEDA, P. Measurement of genetic damage in *Apis mellifera* caused by agrochemicals using comet assay. **Current Topics in Toxicology**, v.15, p.133-139, 2019. <https://doi.org/10.31300/CTTX.15.2019.133-139>

WU, J. Y.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Sub-Lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PLoS One**, v.6, n.2, e14720, 2011.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014720>

YAN, S.; CUI, F.; QIAO, C. Structure, function, and applications of carboxylesterases from insects for insecticide resistance. **Protein and Peptide Letters**, v.16 (10), p.1181-1188, 2009.  
<https://doi.org/10.2174/092986609789071243>

**CAPÍTULO 2: A META-ANALYSIS EVALUATING THE MORTALITY OF STINGLESS BEES (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) EXPOSED TO DIFFERENT INSECTICIDES**

Natália Uemura<sup>a</sup>, Lucas Battisti<sup>a</sup>, Nédia de Castilhos Ghisi<sup>b</sup>, Roberta Cornélio Ferreira Nocelli<sup>c</sup>, Claudia Bueno dos Reis Martinez<sup>a</sup>, Silvia Helena Sofia<sup>a,\*</sup>

*<sup>a</sup>Universidade Estadual de Londrina, PPG Ciências Biológicas, CCB, Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380, CP 10.011, 86057-970. Londrina, PR, Brazil*

*<sup>b</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, LABCON, Estrada para Boa Esperança, km 04, Comunidade São Cristóvão, 86660-000, Dois Vizinhos, PR, Brazil*

*<sup>c</sup>Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias da UFSCAR. Via Anhanguera, km 174, Zona Rural, 13600970, CP 153, Araras, SP, Brazil*

\*Corresponding author.

Email address: [shsofia@uel.br](mailto:shsofia@uel.br) (S.H. Sofia)

## ABSTRACT

Stingless bees are key pollinators of wild and crop plants distributed across tropical and subtropical regions worldwide. Despite this, they are currently facing different forms of anthropic pressure, such as the excessive use of insecticides, a common agricultural practice all over the world. After more than two decades of investigations on the effects of different insecticides on these bees, a high volume of information is now available in the literature. In this study, we carried out a meta-analysis to investigate the mortality of stingless bees exposed to several types of insecticides, on the lowest doses and concentrations, both inferior to LD<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> (and most of them ecologically relevant or recommended by the manufacturer). For this, a search was carried out in the databases Web of Science, Scopus, journal portal of CAPES, Pubmed, and Google Scholar, using keywords like “stingless bees” and “insecticides”. The articles that met the criteria established for the analysis were selected. In total, 25 articles were selected, which resulted in a data set of 81. The analyses were categorized by: type of exposure (oral, contact or topic), life stage (larval or adult), bee species and type of insecticide. Overall, the meta-analysis showed that exposure to insecticides resulted in statistically higher bee mortality ( $E^+ = 3.402$ ), regardless of the type of exposure. Regarding the life stage, insecticides were toxic only for adults, but this could also be due to the low number of studies with larvae. As for bee species, the use of insecticides proved to be more toxic for 6 out of the 12 species analysed. In relation to the chemical groups of insecticides analysed (neonicotinoid, pyrethroid, organophosphate, carbamate, pyrazole, spinosyn), most proved to be toxic even at low doses/concentrations. Thus, we concluded that even in low doses/concentrations the insecticides were very harmful to stingless bees.

**Keywords:** Neonicotinoid, Pyrethroid, Organophosphate, Carbamate, Pyrazole, Spinosyn

## INTRODUCTION

With more than 20,000 species described worldwide (Ascher and Pickering, 2020; Orr et al., 2020), bees (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) are considered the main pollinators in most terrestrial ecosystems (Ollerton et al., 2011; Neff and Simpson, 1993). Thus, they play a relevant ecological role in both the maintenance of world biodiversity and the functioning and stability of ecosystems (Ollerton, 2017; Potts et al., 2016). In addition, bees contribute to pollination of approximately 85% of the cultivated crops in the world, helping to provide human food security (Ollerton, 2017; Potts et al., 2016; Giannini et al., 2015; Vanbergen et al., 2013; Klein et al., 2007).

Particularly in tropical regions, where the mean proportion of animal-pollinated plants was estimated at 94% (Ollerton et al., 2011), the presence of pollinators in the maintenance of vegetal communities is paramount.

Despite this, in the last two decades a growing number of studies have reported pollinator declines (e.g., Sanchez-Bayo & Wyckhuys, 2019; Ollerton, 2017; Potts et al., 2016; Regan et al., 2015; Biesmeijer et al., 2006), many of which focus on bee declines (Zattara and Aizen, 2021; Ollerton, 2017; Goulson et al., 2015; Potts et al., 2010; Biesmeijer et al., 2006).

In the Neotropics, native stingless bees (Meliponini) are considered key pollinators for several flowering plant species (Roubik and Patiño, 2018; Michener, 2007; Roubik, 1989) and are responsible for carrying out between 40 and 90% of the pollination of tropical native trees (Kerr et al., 1996). Moreover, it was demonstrated that for some Neotropical humid forests, such as the Brazilian Atlantic Rainforest, stingless bees amount to approximately 70% of all bees foraging on flowers and that

they are also the only bee group concentrated in the upper stratum (Ramalho, 2004). The group are also recognized as pollinators of several economically important crops (Meléndez Ramírez et al., 2018; Cham et al., 2018; Slaa et al., 2006). Concerning stingless bees, it is worth highlighting the invaluable cultural value associated with these bees and their products for several ethnic groups of Tropical America (Quezada-Euán et al., 2018), since both indigenous cultural values and traditional knowledge have been recognized as essential components of biodiversity models and policies (Reyes-González et al., 2020; Quezada-Euán et al., 2018; PBES, 2016).

Stingless bees comprise a diverse group of corbiculate Apidae, distributed in tropical and subtropical regions of the Americas, Africa, Asia, and Australia (Grüter, 2020; Roubik, 1989). They are eusocial bees, living in colonies ranging from a few dozen to 100,000 or more workers (Michener, 2007). Currently, more than 550 species belonging to 58 genera are known (Grüter, 2020). They are most abundant and species-rich across Neotropical Region, where approximately 400 species from 31 genera are distributed (Grüter, 2020; Pedro, 2014; Moure et al., 2012).

Despite their importance as pollinators in tropical forests, similarly to other groups of Apoidea, stingless bees are also being severely threatened by different forms of anthropogenic disturbances across the Neotropics (Costa et al., 2014; Freitas et al., 2009; Villanueva-G. et al., 2005; Kerr et al., 1996), which could put their populations under extinction risk (Cairns et al., 2005; Villanueva-G. et al., 2005). Although habitat loss and fragmentation due to deforestation are among the main threats to wild bees (Freitas et al., 2009; Brown and Albretch, 2001), there is growing concern about the impact of pesticides on the Neotropical native bee fauna and, in particular, on stingless bees (Botina et al., 2020; Cham et al., 2018; Lima et al., 2016; Valdoviños-Núñez et al., 2009).

Most of these studies tested the effects of different pesticides, such as insecticides, fungicides, and herbicides, on several native species of stingless bees occurring across the Brazilian territory. This fact is not surprising, considering that: i) since 2008, Brazil has been the largest consumer of pesticides in total volume in the world (Bombardi, 2017), and among these, the largest consumer of insecticides (Santos et al., 2018); ii) Brazil harbours the highest diversity of stingless bees in the world, with approximately 250 valid species and almost 90 undescribed forms (Pedro, 2014); iii) the main agricultural crops produced in Brazil, covering a large part of the Brazilian territory, are soybean, corn, and sugar cane (Bombardi, 2017), which depend little or not at all on pollinator services. Thus, repeated applications of pesticides on crops such as sugar cane and soybean are the norm (Pignati et al., 2017).

In this hostile scenario to native stingless bees, it should be emphasized that several studies have pointed out that these bees could be more susceptible to pesticides than the honeybees (Tomé et al., 2017; Jacob et al., 2013; Costa et al., 2015; Soares et al., 2015; Arena and Sgolastra, 2014; Lourenço et al., 2012; Valdoviños-Núñez et al., 2009). One of the possible causes for this fact is attributed to the smaller body size of most species of stingless bees compared to *Apis mellifera* L., resulting in a larger body surface area in contact with pesticides (Nocelli et al., 2018).

After more than two decades of investigations on the effects of pesticides on stingless bees, a high volume of information is now available in the literature. Among the publications, most investigated the effects of insecticides on stingless bees, which can be divided into two sets of studies: i) one considering both the lethal concentration (LC) and dose (LD) of distinctive pesticides on different species of stingless bees (e.g., Padilha et al., 2020; Del Sarto et al., 2014; Lourenço et al., 2012; Valdoviños-Núñez et al., 2009); and, ii) another evaluating the sublethal doses and concentrations of different

pesticides on these bees (e.g., Marques et al., 2020; Boff et al., 2018; Morais et al., 2018; Otesbelgue et al., 2018; Ravaiano et al., 2018; Tomé et al., 2012). Taking into consideration the large amount of information, even when considering the set of results of these two types of approaches separately, conclusions can be difficult. Furthermore, conflicting results between lab and field studies can occur (Main et al., 2018; Pisa et al., 2015).

Concerns about the effects of pesticides (especially insecticides) on bees and other non-target arthropods have resulted in a growing body of literature on this subject, and in the last decade several reviews have been published (Abati et al., 2021; Siviter et al., 2021; Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019; Lima et al., 2016; Pisa et al., 2015; Goulson, 2013; Blacquièrre et al., 2012). More recently, the meta-analysis has emerged as a useful tool for compiling and interpreting sets of results from different studies (Main et al., 2018; Arena and Sgolastra, 2014; Hua and Bureau, 2012; Fagard et al., 1996). Based on mathematical criteria for analysing and synthesizing large sets of data, meta-analysis enables the construction of a statistically reliable conclusion on the subject (Battisti et al., 2021; Hua and Bureau, 2012; Fagard et al., 1996).

In fact, more recently, a growing number of publications have been making use of meta-analysis for dealing with large sets of data. However, regarding the subject “bees and pesticides”, publications involving meta-analysis are still scarce (e.g., Battisti et al., 2021; Botina et al., 2020; Arena and Sgolastra, 2014). Considering the relevance of this group of bees and the lack of a meta-analysis that assesses the mortality of stingless bees exposed to different chemical groups of insecticides, the aim of the current study was to evaluate, using this tool, the lethal (mortality) effects of insecticides on stingless bees. For this, based on data from different publications, we conducted our meta-analysis on the lowest doses and concentrations, both inferior to

LD<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub> (and most of them ecologically relevant or recommended by the manufacturer), of several types of insecticides which caused mortality in stingless bees.

## **MATERIAL AND METHODS**

### *Study development, data search and structuring*

This meta-analytic review was developed in accordance with the recommendations of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA, 2015). The search for the papers used in this study was carried out in the following electronic databases: journal portal CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil), Web of Science, Scopus, PubMed, and Google Scholar. The main terms used in the search were: "stingless bees" OR "Meliponini" OR "Meliponina" AND "insecticide" OR "pesticide" OR "agrochemical" OR "toxicity" OR "mortality" OR "lethal" OR "sublethal" OR "LC50" OR "LD50". These keywords were searched in English and Portuguese.

For the preparation of this meta-analysis, articles published until October 2021 were searched. The selected articles were required to contain mortality/survival data on stingless bee species. There was no limitation regarding the stage of development (larval or adult), country, author, type of insecticide, or language of the work.

After the selection of the papers, a table was created (Table S1), containing the following information: authors, year of publication, type of exposure to the insecticide (topical, oral, or contact), life stage (adult or larval), species, insecticide identification (active ingredient name and chemical group category), exposure time, insecticide dose/concentration, total number of live bees and total number of dead bees in treatments (experimental group and control group), and environmentally relevant doses or doses recommended by the manufacturer.

To extract information on doses/concentrations of some studies we used the software WebPlotDigitizer [<https://automeris.io/WebPlotDigitizer>]. Some of the selected papers did not contain the exact number of live/dead bees in the experimental and control groups, only the toxicity values. In these cases, we contacted the authors to request the submission of additional information. It was not possible in all cases to access the data, either because they were not forwarded by the authors or because we did not receive a response from the authors.

It is noteworthy that the papers that analysed only the species *A. mellifera* or other groups of bees (e.g., *Bombus* spp. and solitary bees) were not included in the analysis, since the present study aims to observe the effects of insecticides only on stingless bees. In addition, studies that exclusively assessed the effects of herbicides or fungicides on stingless bees (e.g., Prado et al., 2020) were not included in the meta-analysis. Therefore, the main exclusion criteria for the studies were: i) data with insufficient information for the meta-analysis; ii) absence of the number of living and dead individuals in the experimental and control groups (or the percentage of mortality); iii) studies with species of bees not classified in the group of stingless bees (Meliponini).

#### *Data analysis*

In addition to the criteria mentioned above, in our meta-analysis we only considered the lowest doses or concentrations (always inferior to LD<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub>, respectively) of insecticides or a combination of insecticides. This was done because the focus of our study was to analyse, where possible, the mortality effect of doses/concentrations recommended by manufacturers or environmentally relevant doses/concentrations. With the data collection, categorizations were made for the

analyses: by bee species, life stage (larvae or adult), chemical groups of insecticides and type of exposure (oral, topic or contact).

Data analysis was carried out according to Battisti et al. (2021). All analyses were conducted in OpenMEE free software (Viechtbauer, 2016). The effect of each variable was calculated using the Odds Ratio – Log scale (Borenstein et al., 2009).

The Odds Ratio allows you to calculate the odds of an event (like dying/living ratio) in each group (eg treated vs. control). This estimator looks less intuitive but has more advantageous statistical properties for meta-analysis. All methods that estimate effect sizes  $E^+$  (summary effect), vary from  $-\infty$  to  $+\infty$ , where 1 is the absence of difference between the control and the experimental groups (Battisti et al., 2021). Values above 1 (not crossing the null) indicate that the experimental group has a higher value than the control group and values below 1, also not crossing the null, indicate that the control group has a higher value than the experimental group (Hedges, 1981). Values for which the confidence interval (CI) does not cross null are significant. To estimate  $t^2$  the variance of the true log odds ratios, we use the Random-effects (DerSimonian and Laird) method, because we have enough number of studies.

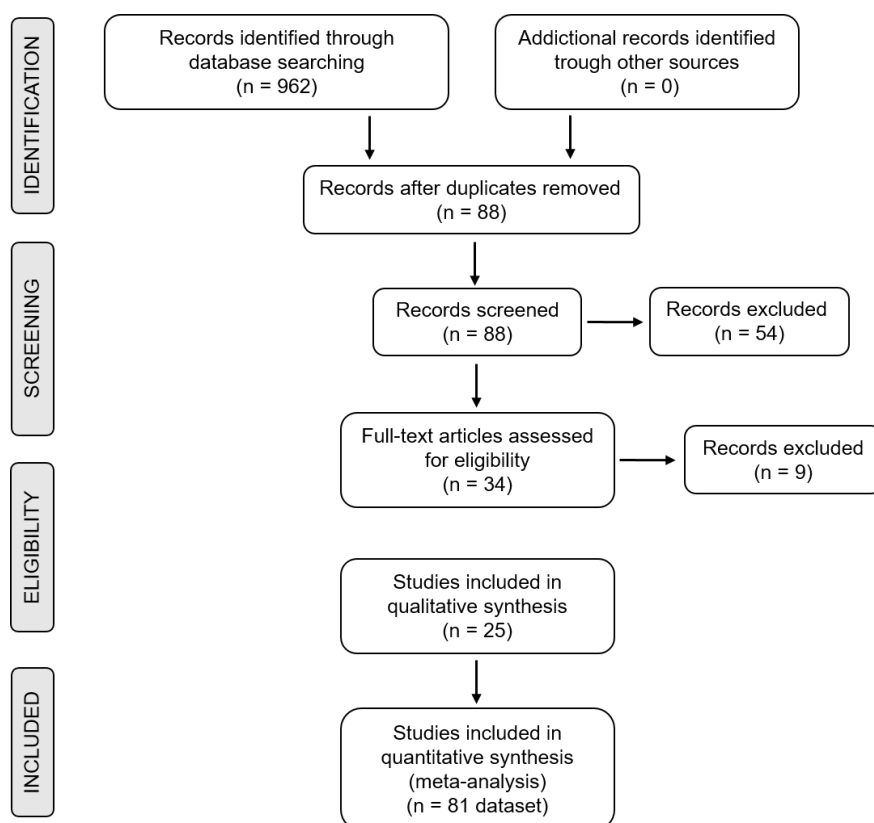
The heterogeneity between the studies was estimated by the Cochran's (Q) and  $I^2$  statistics (Borenstein et al., 2009). The  $I^2$  statistic describes the percentage of total variation in point estimates that can be attributed to heterogeneity. For metric  $I^2$ , low, moderate, and high values were considered 25%, 50%, and 75%, respectively (Higgins, 2008). An  $I^2 \geq 75\%$  was considered as highly heterogeneous and not attributable to chance (Van Maele-Fabry et al., 2011).

Publication bias was analysed using the Kendall method, which is more suitable when considering a smaller number of data sets (Rosenberg et al., 2000). The safe number of failures was determined by the Orwin method, which allows determination of

the number of missing studies that would take the general effect to a specified level other than zero ( Orwin and Boruch, 1982; Borenstein et al., 2009). A funnel plot was generated to explore the data, considering, in this case, that it is essential to interpret the numerical data generated by the above methods.

## RESULTS

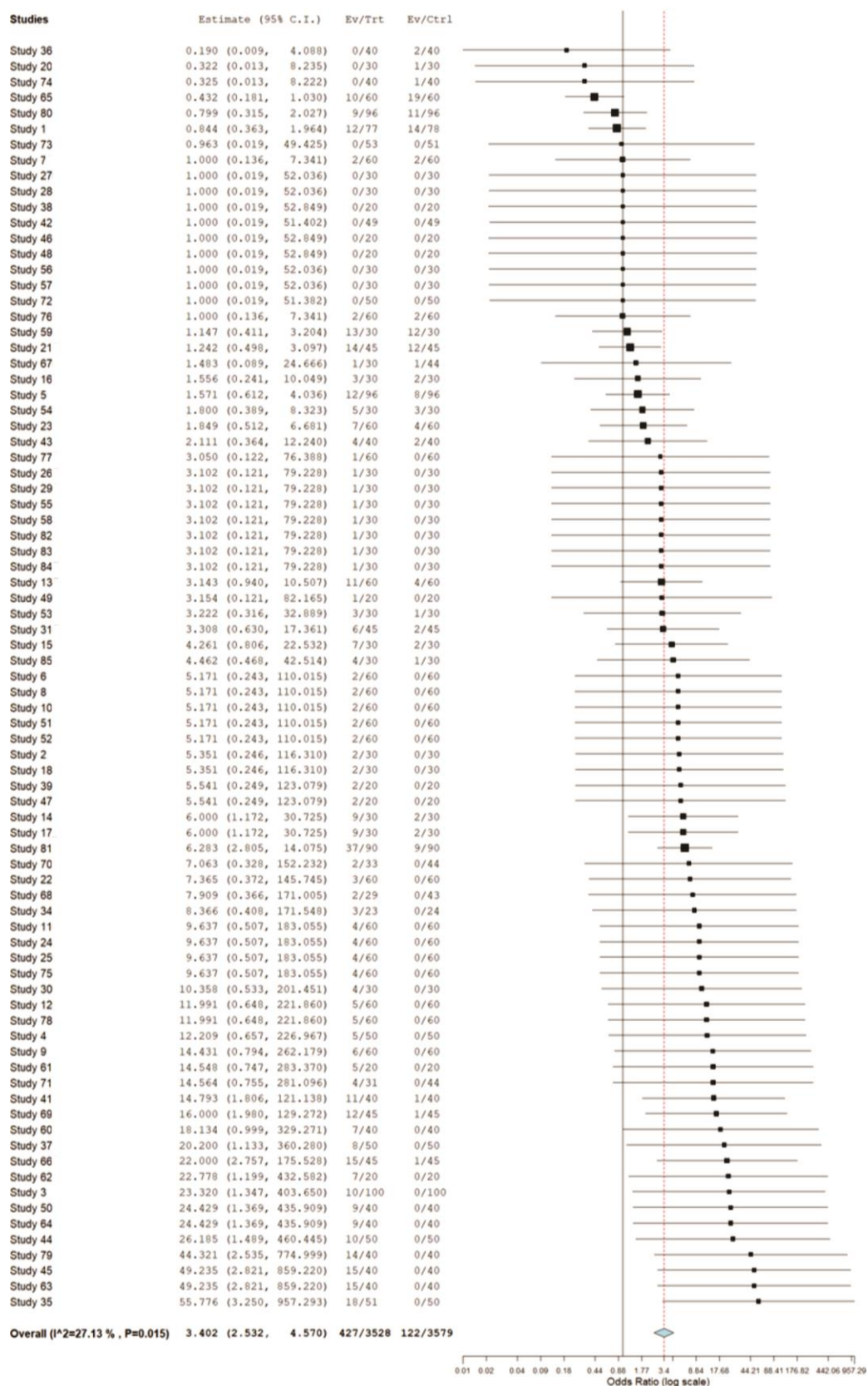
Based on our initial search conducted in the databases, we obtained 88 papers, of which 25 were selected as they met all the inclusion criteria (e.g., stingless bees, mortality, insecticides), generating 81 data in the dataset (Fig. 1, Table S1).



**Fig. 1.** Flowchart containing the papers found and selected according to the search keywords in the databases, resulting in 81 analyzed datasets. Adapted of PRISMA (2015).

Overall, the meta-analysis showed that exposure to insecticides resulted in statistically higher bee mortality ( $E+ = 3.402$ , 95% CI = 2.532 to 4.570, and p-value <

0.001) (Fig. 2). Both Cochran's Q statistic  $Q (df = 80) = 109.789$ ,  $\text{Tau}^2 = 0.402$ , p-Value 0.015 and the  $I^2$  test revealed data heterogeneity, with  $I^2 = 27.133$  and, therefore, superior to 25%. Based on this, the random effect model was considered as the most suitable for data analysis in our study.



**Fig. 2.** Papers analyzed in this study, which evaluated the effects of different insecticides on mortality/survival of native stingless bees. The values of the first column

represent the summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values  $E_v/Trt$  and  $E_v/Ctrl$  is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values ( $I^2$  and P).

When data were categorized according to life stage (larval or adult), the type of exposure (ingestion, topic, or contact), chemical group of insecticide, and bee species, the meta-analysis also detected higher mortality of the insecticide group in all categories. Concerning life stages,  $E+$  was 3.731 (95% CI = 2.840-4.901,  $p < 0.001$ ) to adults and  $E+ = 1.245$  (95% CI = 0.486-3.190,  $p = 0.648$ ) to larvae. Our results indicated that the pesticides were toxic only to adults. However, we got 76 studies with adults and only 5 studies with larvae (Fig. 3).

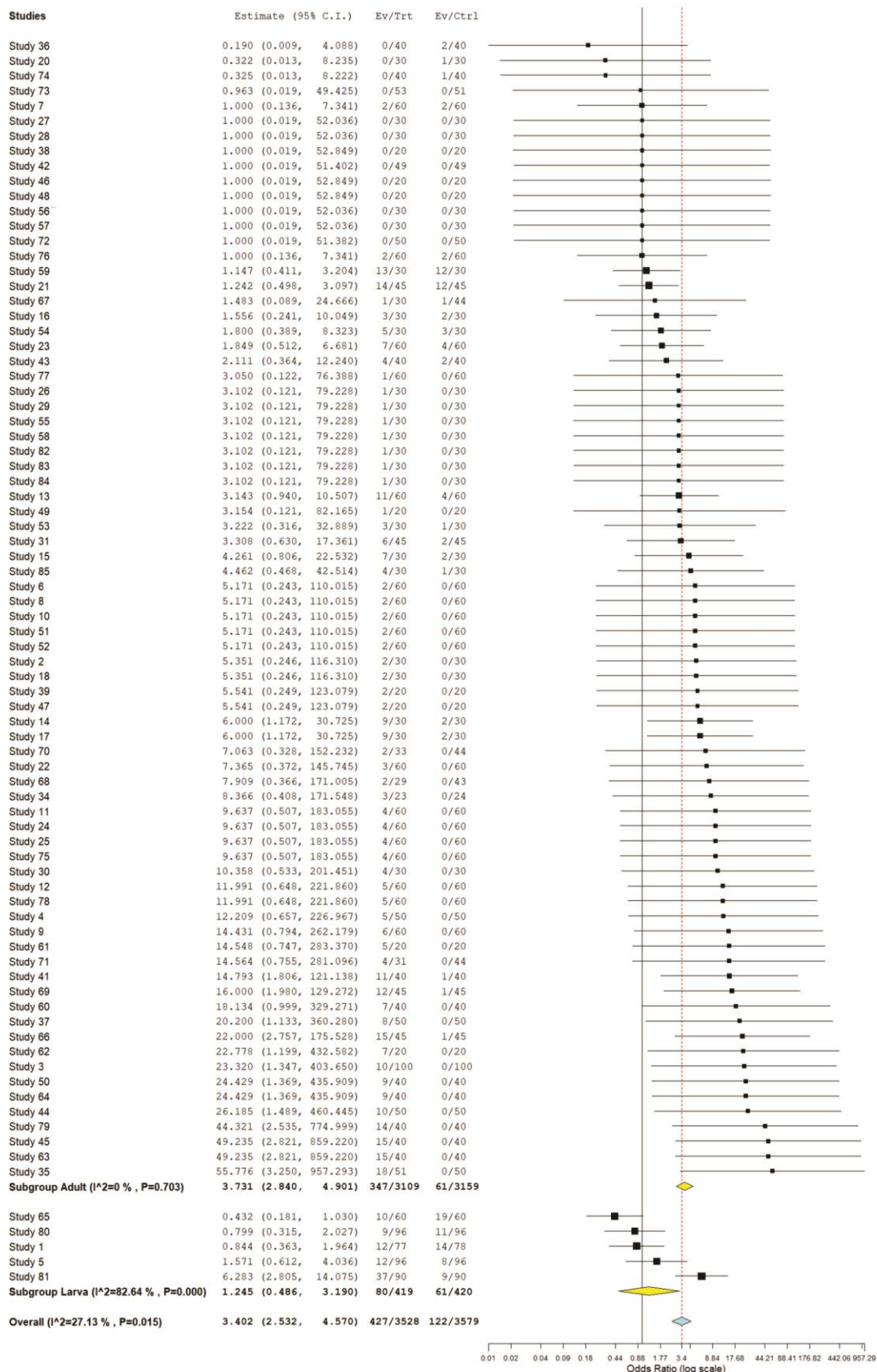
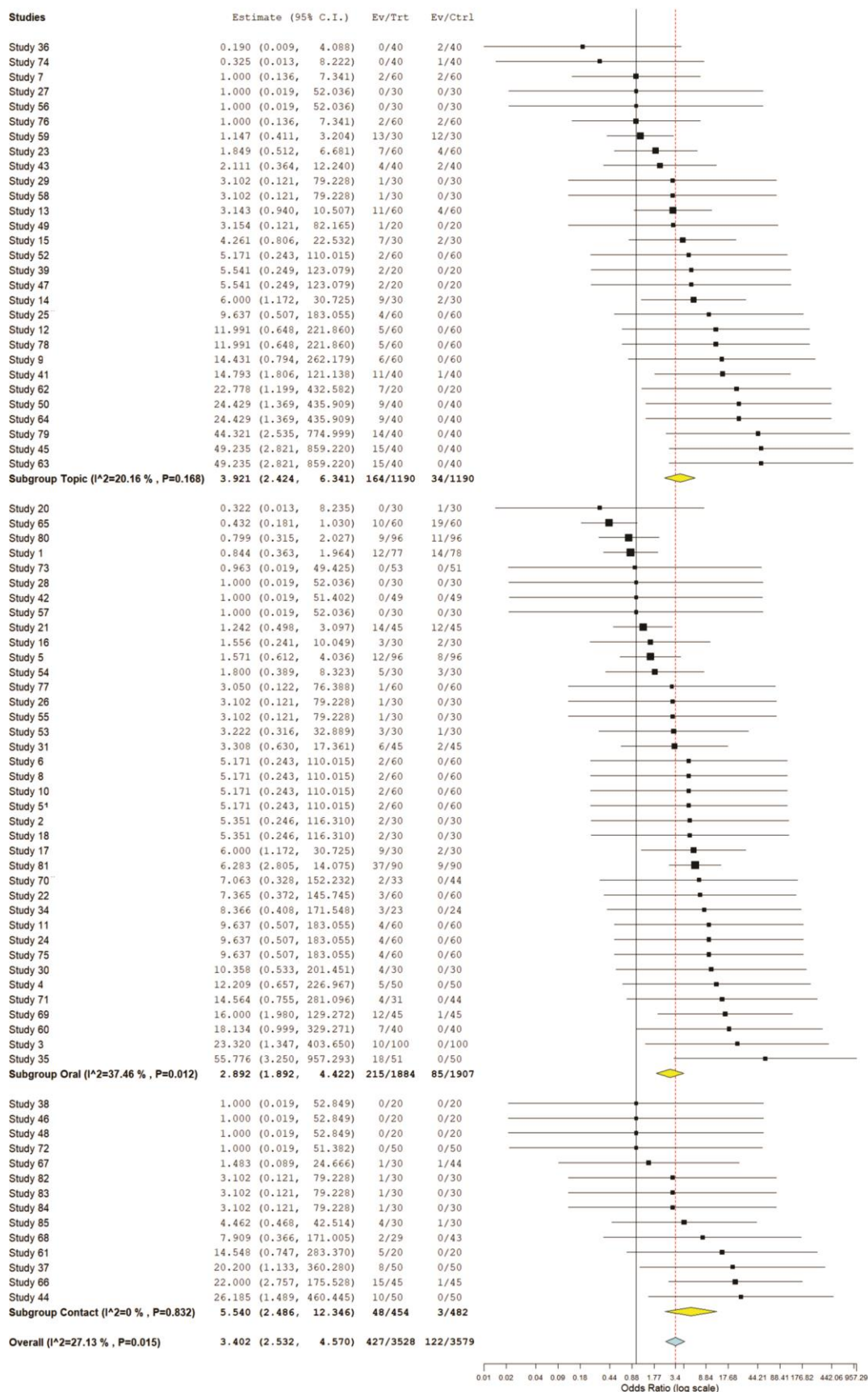


Fig. 3. Forest plot with the results obtained from the analyzed studies, categorized by

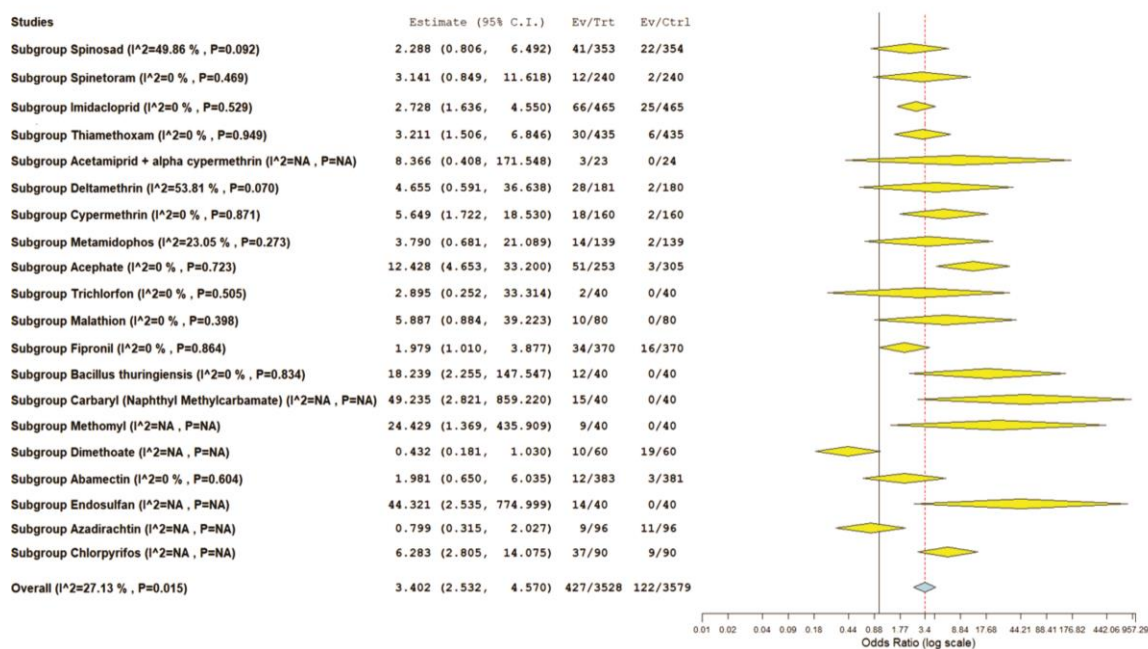
life stage. The values of the first column represent the summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values ( $I^2$  and P).

All the types of exposure presented significant mortality increase in bees. The topic exposure, with 29 studies, presented  $E+ = 3.921$  (95% CI = 2.424-6.341) and  $p < 0.001$ . The oral exposure, with 38 studies, presented  $E+ = 2.892$  (95% CI = 1.892-4.422) and  $p < 0.001$ . Finally, with 14 studies, bees exposed by contact presented  $E+ = 5.540$  (95% CI = 2.486-12.346,  $p < 0.001$ ) (Fig. 4).



**Fig. 4.** Forest plot with the results obtained from the analysed studies, categorized by type of exposure. The values of the first column represent summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values (I<sup>2</sup> and P).

In the category of chemical group of the insecticide, of the ten analysed groups, seven had higher mortality in treatment than in the control group: pyrethroid E+ = 5.367 (95% CI = 2.067-13.930,  $p < 0.001$ ), neonicotinoid E+ = 2.871 95% CI = 1.879-4.387,  $p < 0.001$ ), organophosphate E+ = 5.050 (95% CI = 2.137-11.935,  $p < 0.001$ ), spinosin E+ = 2.356 (95% CI = 1.085-5.116,  $p < 0.03$ ), pyrazole E+ = 1.979 (95% CI = 1.010-3.877,  $p = 0.047$ ), carbamate E+ = 34.775 (95% CI = 4.568-264.711,  $p < 0.001$ ) and organochlorine E+ = 44.321 (95% CI = 2.535-774.999) (Fig. 5).

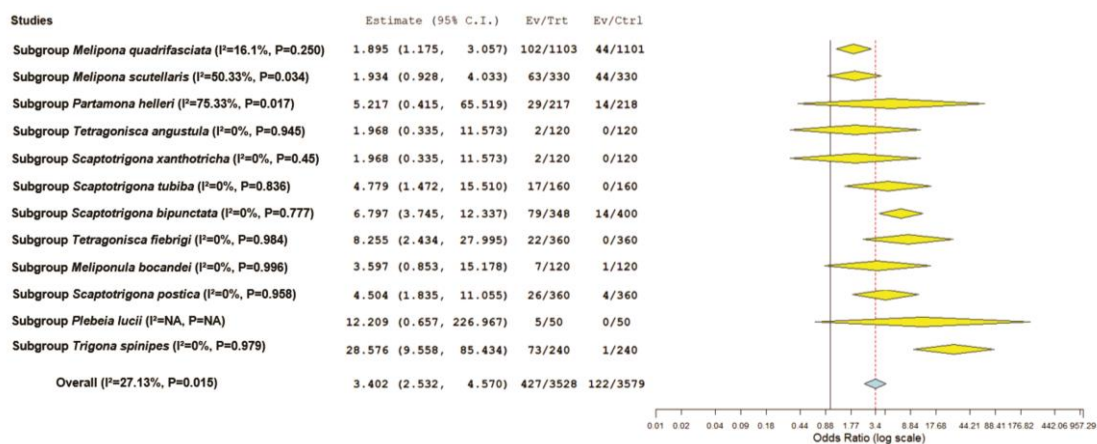


**Fig. 5.** Forest plot with the results obtained from the analyzed studies, categorized by insecticide type. The values of the first column represent summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values (I<sup>2</sup> and P).

Insecticides from the avermectin group E+ = 1.981 (95% CI = 0.650-6.035,  $p = 0.229$ ), biological insecticides E+ = 4.613 (95% CI = 0.390-54.541,  $p = 0.225$ ) and neonicotinoid + pyrethroid E+ = 8.366 (95% CI = 0.408-171.548) did not show

significant value in the experimental group compared to the control group. But each of the groups was evaluated by only two papers (one for neonicotinoid + pyrethroid) so the results of these chemical groups should be considered carefully.

In the category of bee species, significant values of E+ were found for 6 out of 12 species of Meliponini analysed (Fig. 6). There was no significant effect of insecticides on mortality for *Melipona scutellaris* with E+ = 1.934 (95% CI = 0.928-4.03, p = 0.078), *Partamona helleri* with E+ = 5.217 (95% CI = 0.415-65.519, p = 0.201), *Tetragonisca angustula* with E+ = 1.968 (95% CI = 0.335-11.573, p = 0.454), *Scaptotrigona xanthotricha* with E+ = 1.968 (95% CI = 0.335-11.573, p = 0.454), *Meliponula bocandei* with E+ = 3.597 (95% CI = 0.853-15.178, p = 0.081) and *Plebeia lucii* with E+ = 12.209, (95% CI = 0.657-226.967) (Fig. 6).



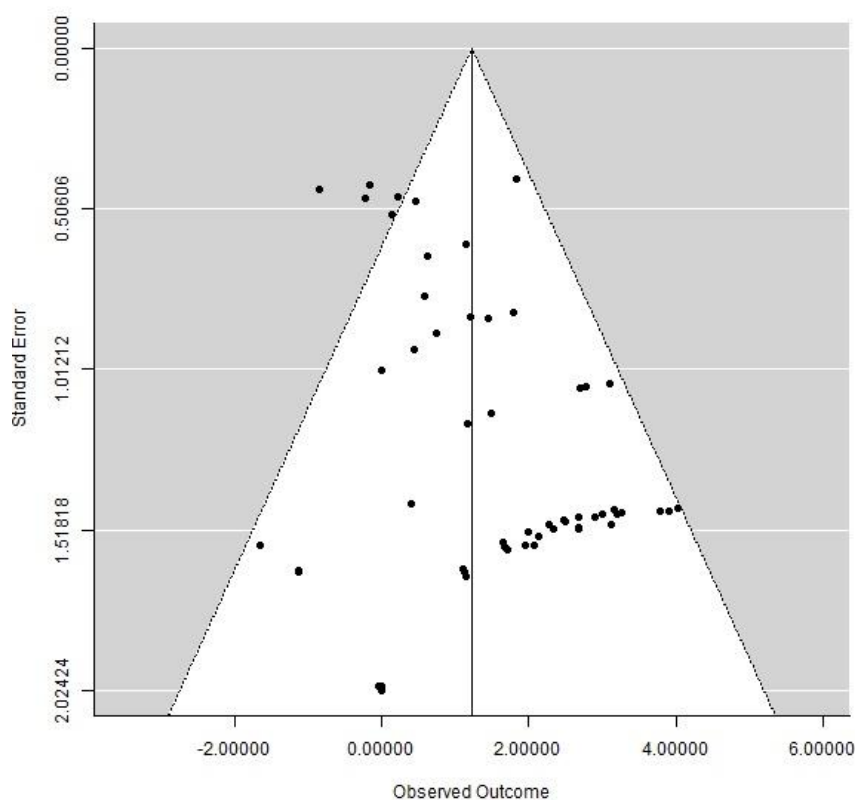
**Fig. 6.** Forest plot with the results obtained from the analysed studies, categorized by bee species. The values of the first column represent summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values (I<sup>2</sup> and P).

#### Publication Bias

The Kendall's coefficient, used to observe possible bias in the analysed data, showed a statistically significant correlation (0.2632; p < 0.0005), indicating some

publication bias and data bias. Conversely, the Orwin approach value of fail-safe (N) was 81, indicating that the effect of missing studies on this meta-analysis is zero.

Once more, in the analysis considering only the types of insecticides, while Kendall's tau indicated significant publication bias (0.3033;  $p = 0.0002$ ), the fail-safe number detected by the Orwin approach was 72.



**Fig. 7.** Funnel plot for the association of bee mortality with insecticides exposure. The X-axis represents the observed outcome and the Y – Axis represents the standard error.

## DISCUSSION

Overall, the meta-analysis carried out in our study, revealed strong evidence for a significant effect of insecticides causing stingless bee mortality even when field-realistic levels were considered in the analyses. In some cases, the doses tested by the

authors are below the doses found in the field. For instance, the lowest dose tested using imidacloprid in *M. quadrifasciata* (0.05 ppm – Brito et al., 2020) and *M. scutellaris* (0.00089 ppm – Rosa-Fontana et al., 2020) was below the dose found in the field (0.05 ppm pollen and 0.02 ppm nectar – Sanchez-Bayo and Goka, 2014).

Thus, our findings support the hypothesis that even in sub-lethal doses, most of which are recommended by the manufacturers for use in different crops, insecticides can represent an important risk factor associated with the decline in stingless bee populations, as reported elsewhere (Kerr et al., 1999). When we consider that most of the studies analysed herein were carried out in Brazil and focused on Brazilian native bee species, the scenario is worrying for several reasons. Although harbouring the most diverse stingless bee fauna in the world (Grüter, 2020; Pedro, 2014), Brazil is currently one the largest consumers of pesticides on the planet, among them several hazardous insecticides (Pignati et al., 2017). In addition, recently, analysing the international regulatory situation of pesticides authorized for use in Brazil, Friedrich et al. (2021) reported that approximately 80% of pesticides authorized for use in Brazil do not have a use permit in at least three Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) countries, including those that have important economic activity in agriculture. Another worrying factor is that agricultural areas have increased greatly in recent decades, a condition which is associated with both growth in the use of insecticides and other pesticides (Bombardi, 2017) and deforestation (Pignati et al., 2017).

Concerning the set of insecticides belonging to seven chemical groups (spinosyn, neonicotinoid, organophosphate, pyrethroid, carbamate, pyrazole, and avermectin) from groups of insecticides most common in the meta-analyses data set (Table S1), it is noticeable that some of them, e.g., fipronil (pyrazole), imidacloprid and thiamethoxam (both neonicotinoids), whose use was initially limited by IBAMA

(Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources) due to damage to bees, are now liberated for use by the Brazilian government (Friedrich et al., 2021). Our meta-analysis includes several insecticides belonging to the list of 20 active substances with the highest volume of commercialization in 2017 in Brazil, such as imidacloprid, acephate, and malathion (Friedrich et al., 2021). These latter two insecticides belong to the organophosphates chemical group and are currently unauthorized for use by the European Community (Friedrich et al., 2021).

Although studies assessing the effects of insecticides on Meliponini larvae have been carried out by different authors in the last decade (Araujo et al., 2019; Dorigo et al., 2018; Barbosa et al., 2015; Tomé et al., 2012), and detailed and well-established *in vitro* larval rearing protocols have been published (Botina et al., 2020; Dorigo et al., 2019), data on mortality of stingless bee larvae exposed to insecticides are still scarce, particularly when compared to the number of toxicological studies involving adult bees. Unfortunately, therefore, our meta-analysis data on larva mortality were based on few studies ( $N = 5$ ). Thus, this result needs to be interpreted with caution given that most studies focused on adults. Similarly, studies evaluating chronic exposure of bees to insecticides are rare (Sanchez-Bayo and Goka, 2014), which explains why the category chronic x acute exposure was not considered in our meta-analysis. Distinctively, the large amount of data on the acute exposure of adult bees, herein analysed, give high support to our findings, reinforcing that insecticides are usually very harmful to stingless bees. Our additional analysis to separately assess the mortality effect caused by different types of active ingredients on stingless bees confirmed that the main insecticides currently used in agriculture in Brazil and other regions of the globe are dangerous to this group of bees, as already detected for other groups of these pollinators (Botina et al., 2020; Lima et al., 2016; Sanchez-Bayo and Goka, 2014; Blacquièrè et al.,

2012). Furthermore, since several of the insecticides analysed herein have been detected in pollen, nectar, and honey stored in nests of some social bees (Sanchez-Bayo and Goka, 2014; Johnson et al., 2010), the cumulative risks of these pesticides to larvae and adult bees should be taken into consideration. Especially in Meliponini, which usually consume fresh and/or poorly processed pollen, present in mass provisions administered to larvae, this resource seems to represent a more important route of contamination (Cham et al., 2018).

Concerning the three routes of exposure (oral, contact, and topic), the meta-analyses revealed that they were equally relevant to drive mortality in stingless bees. This finding is particularly interesting, since most of the studies included in the meta-analysis assessed the effects of insecticides in forager bees (adult bees collected in the entrance of the nest), which are naturally exposed to insecticides via these three contact routes. For instance, in addition to being exposed to contamination via food, foragers are under a strong risk of contamination through spray drift of insecticide drops, scattered during foliar crop spraying (Sanchez-Bayo and Goka, 2014), when they are out of the colony. Moreover, it should be highlighted that although the contact of bees with insecticides may not lead to immediate death, several studies have demonstrated that the sublethal effects caused by these pesticides on stingless bees, can be very harmful to the bees and their colonies (Farder-Gomes et al., 2021; Diniz et al., 2020; Marques et al., 2020; Araújo et al., 2019; Tomé et al., 2015). Thus, the significant mortality caused by both contact and topic exposures represents an important and worrying finding.

There is accumulating evidence that pesticides are one of the main causes driving bee decline worldwide (Abati et al., 2021; Siviter et al., 2021; Sánchez-Bayo and Wyckhuys, 2019; Goulson et al., 2015; Potts et al., 2010). Recently, a meta-analysis

carried out by Siviter et al. (2018) demonstrated that pesticide exposure negatively impacted bee learning and memory at field-realistic doses. In addition, in a more recent study, a synergistic effect of exposure to various stressors (such as parasites and pesticides and poor nutrition) was observed, causing bee mortality (Siviter et al., 2021).

Despite being non-target organisms, bees, and particularly stingless bees have proven to be very sensitive to different types of insecticides (Lima et al., 2016). Concerning the effects on stingless bee mortality, several studies have also demonstrated that most of the insecticides analysed herein can impair the flight performance (Tomé et al. 2015; Marques et al. 2020), development (Tomé et al., 2012; Araujo et al., 2019), morphology (Farder-Gomes et al., 2021; Diniz et al., 2020; Araujo et al., 2019; Morais et al., 2018; Tomé et al., 2012), food consumption (Brito et al., 2020), locomotion activity (Brito et al., 2020; Jacob et al., 2019; Tomé et al., 2012), and communication (Costa et al., 2020; Araujo et al., 2019; Boff et al., 2018). A rising risk to stingless bees is related to the fact that most of the insecticides analysed in our meta-analysis are widely used worldwide (Friedrich et al, 2021), and especially in developing countries, in tropical regions, where stingless bees are distributed (Grüter, 2020; Cham et al., 2018). In 2019 and 2020, in Brazil, 474 and 493 new pesticides were registered, respectively, some of them classified as highly toxic to bees (Nunes et al., 2021). The insecticides evaluated in our meta-analysis are among classes I to III in the classification of potential for environmental hazard, which ranges from I to IV, with I considered as a dangerous product for the environment and IV as a product that is not very dangerous for the environment (IBAMA, 2021).

Considering that the set of studies in the current meta-analysis assessed the sub-lethal effects of insecticides on Brazilian stingless bees, most in doses/concentrations within the range recommended by manufacturers, we could expect that when used in the

field these insecticides would result in mortality of most species analysed. On the other hand, since all data used in our meta-analysis were extracted from studies carried out in laboratories, we must consider our findings with caution. Different authors have recommended that further field studies measuring the impacts of pesticide exposure on bees are needed before drawing a conclusion (Lundin et al., 2015; Blacquièrè et al., 2012). In addition, many of the lethal and sublethal effects of some insecticides obtained in laboratory studies, have shown no effects in field studies with field-realistic dosages (Blacquièrè et al., 2012).

## **CONCLUSION**

Thus, this meta-analysis showed that most chemical groups of insecticides that have been used in crops are toxic for stingless bees, regardless of the type of exposure, even at low doses. In addition, the results found for the larvae show the importance of further studies evaluating the effects of insects, when exposed during the larval stage, for a better elucidation of the results. Thus, toxicity studies must be taken into account in order to rethink how to use pesticides in crops, aiming at sustainable development, in a way that does not harm bees and other pollinators.

1 **Credit author statement**

2

3 **Natália Uemura:** conceptualization, methodology, data acquisition, formal  
4 analysis, writing (original draft preparation and editing). **Lucas Battisti:**  
5 conceptualization, methodology, formal analysis, writing (original draft preparation).  
6 **Nédia de Castilhos Ghisi:** conceptualization, methodology, formal analysis, writing  
7 (original draft suggestions). **Roberta Cornélio Ferreira Nocelli:** conceptualization and  
8 writing (original draft preparation). **Claudia Bueno dos Reis Martinez:**  
9 conceptualization and writing (original draft preparation). **Silvia Helena Sofia:** funding  
10 acquisition, project administration, supervision, writing preparation and editing.

11

12 **Declaration of competing interest**

13 The authors declare that they have no known competing financial interests or  
14 personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this  
15 paper.

16

17 **Acknowledgements**

18 This study was funded by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de  
19 Nível Superior - Brazil (CAPES) - Finance Code 001 and by  
20 A.B.E.L.H.A./IBAMA/MMA/ MCTIC (Grant: CNPq-400614/2018-9). N. Uemura  
21 thanks CAPES, Fundação Araucária and CNPq for the scholarship awarded; S.H. Sofia  
22 (PQ 305343/2018-1), C.B.R. Martinez, and N.C. Ghisi are research fellows from  
23 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brazil (CNPq).

## 24 FIGURE CAPTIONS

25

26 **Fig. 1.** Flowchart containing the papers found and selected according to the search  
27 keywords in the databases, resulting in 81 analyzed datasets. Adapted of PRISMA  
28 (2015).

29 **Fig. 2.** Papers analyzed in this study, which evaluated the effects of different  
30 insecticides on mortality/survival of native stingless bees. The values of the first column  
31 represent the summary effect (E+) followed by the confidence interval (95%) of each  
32 study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the number of dead individuals/total individuals  
33 of treatment and control, respectively. In the last line are the summary effect and the  
34 heterogeneity values ( $I^2$  and P).

35 **Fig. 3.** Forest plot with the results obtained from the analyzed studies, categorized by  
36 life stage. The values of the first column represent the summary effect (E+) followed by  
37 the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the  
38 number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In  
39 the last line are the summary effect and the heterogeneity values ( $I^2$  and P).

40 **Fig. 4.** Forest plot with the results obtained from the analysed studies, categorized by  
41 type of exposure. The values of the first column represent summary effect (E+)  
42 followed by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl  
43 is the number of dead individuals/total individuals of treatment and control,  
44 respectively. In the last line are the summary effect and the heterogeneity values ( $I^2$  and  
45 P).

46 **Fig. 5.** Forest plot with the results obtained from the analyzed studies, categorized by  
47 insecticide type. The values of the first column represent summary effect (E+) followed

48 by the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the  
49 number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In  
50 the last line are the summary effect and the heterogeneity values ( $I^2$  and P).

51 **Fig. 6.** Forest plot with the results obtained from the analysed studies, categorized by  
52 bee species. The values of the first column represent summary effect (E+) followed by  
53 the confidence interval (95%) of each study. The values Ev/Trt and Ev/Ctrl is the  
54 number of dead individuals/total individuals of treatment and control, respectively. In  
55 the last line are the summary effect and the heterogeneity values ( $I^2$  and P).

56 **Fig. 7.** Funnel plot for the association of bee mortality with insecticides exposure. The  
57 X-axis represents the observed outcome and the Y – Axis represents the standard error.

58 **Table S1.** Data taken from the articles analysed in the meta-analysis. Studies indicated  
59 by numbers, authors, type of exposure, life stage, studied species, chemical group,  
60 exposure time, number of alive and dead bees, from control group (AC and DC,  
61 respectively), as well as value of analysed dose and number of alive and dead bees,  
62 from the experimental group (AT and DT, respectively) (Lines 1, 32, 33 and 40 were  
63 removed due to problems with data analysis)

64

**REFERENCES**

- Abati, R.; Sampaio, A.R.; Maciel, R.M.A.; Colombo, F.C.; Libardoni, G.; Battisti, L.; Lozano, E.R., et al., 2021. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 32282–32298. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14224-7>
- Araujo, R.S., Bernardes, R.C., Fernandes, K.M., Lima, M.A.P., Martins, G.F., Tavares, M.G., 2019. Spinosad-mediated effects in the post-embryonic development of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Environ. Pollut.* 253, 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.087>
- Ascher J.S., Pickering J., 2020. Discover Life Bee Species Guide and World Checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila) [(accessed on 27 April 2021)]. Available online: [http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea\\_species](http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species)
- Barbosa, W.F., Tomé, H.V.V., Bernardes, R.C., Siqueira, M.A.L., Smagghe, G., Guedes, R.N.C., 2015. Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (9), 2149-2158. <https://doi.org/10.1002/etc.3053>
- Battisti, L., Potrich, M., Sampaio, A.R., Ghisi, N.C., Costa-Maia, F.M., Abati, R., Martinez, C.B.R., et al., 2021., Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review. *Sci. Total Environ.* 767, 145397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145397>
- Biesmeijer, J.C., Roberts, S.P.M., Reemer, M., Ohlemüller, R., Edwards, M., Peeters, T., Schaffers, A.P., et al., 2006. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science.* 313, 351-354. <https://doi.org/10.1126/science.1127863>
- Blacquière, T., Smagghe, G., van Gestel, C.A M., Mommaerts, V., 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology.* 21, 973-992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>
- Boff, S., Friedel, A., Mussury, R.M., Lenis, P.R., Raizer, J., 2018. Changes in social behavior are induced by pesticide ingestion in a Neotropical stingless bee. *Ecotox. Environ. Saf.* 164, 548-553. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.061>

Bombardi, L.M., 2017. Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia. São Paulo: FFLCH – USP. 296p.

Borenstein, M., Hedges, L.V., Higgins, J.P.T., Rothstein, H., 2009. Introduction to meta-analysis. Chichester, U.K: John Wiley & Sons.

Botina, L.L., Vélez, M., Barbosa, W.F., Mendonça, A.C., Pylro, V.S., Tótola, M.R., Martins, G.F., 2019. Behavior and gut bacteria of *Partamona helleri* under sublethal exposure to a bioinsecticide and leaf fertilizer. Chemosphere. 234, 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.048>

Botina, L.L., Bernardes, R.C., Barbosa, W.F., Lima, M.A.P., Guedes, R.N.C., Martins, G.F., 2020. Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). MethodsX. 7, 100906. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100906>

Brito, P., Elias, M., Silva-Neto, C., Sujii, E., Silva, D., Gonçalves, B., Franceschinelli, E., 2020. The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. Environ. Sci. Pollut. Res. 27, 38654-38661. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08530-9>

Brown, C., Albrecht, C., 2001. The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. J. Biogeogr. 28, 623-634. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00583.x>

Cairns, C.E., Villanueva-Gutierrez, R., Koptur, S., Bray, D.B., 2005. Bee Populations, Forest Disturbance, and Africanization in Mexico. Biotropica. 37 (4), 686-692.

Cham, K.O., Nocelli, R.C.F., Borges, L.O., Viana-Silva, F.E., Tonelli, C.A.M., Malaspina, O., Menezes, C., et al., 2018. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. Environ. Entomol. 48 (1), 36-48. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy137>

Chibee, G. U., Ojelabi, O.M., Fajana, H.O., Akinpelu, B.A., Kehinde, T.O., Awodiran, O.M., Obuotor, E.M., et al., 2021. Effects of cypermethrin as a model chemical on life cycle and biochemical responses of the tropical stingless bee *Meliponula bocandei* Spinola, 1853. Environ. Adv. 5, 100074. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100074>

- Costa, E.M., Araujo, E.L., Maia, A.V.P., Silva, F.E.L., Bezerra, C.E.S., Silva, J.G., 2014. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. 2014. *Apidologie*. 45, 34-44. <https://10.1007/s13592-013-0226-5>
- Costa, L.M., Grella, T.C., Barbosa, R.A., Malaspina, O., Nocelli, R.C.F., 2015. Determination of acute lethal doses (LD<sub>50</sub> and LC<sub>50</sub>) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*. 62 (4), 578-582. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.792>
- Costa, L.M., Barchuk, A.R., Teixeira, I.R.V., 2020. Efeitos do neonicotinoide imidacloprido no comportamento alimentar de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. *Rev. Agrogeoambiental*. 12 (1), 143-153. <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v12n120201411>
- Del-Sarto, M.C., Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Campos, L.A.O., 2014. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*. 45 (5), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0281-6>
- Diniz, T.O., Pereira, N.C., Pizzaia, W.C.S., Sinópolis-Giglioli, A.A., Silva, B.G., Borges, Y.M., Guedes, T.A., et al., 2020. Toxicity and genetic analysis of bees *Scaptotrigona bipunctata* after contamination with insecticide acephate. *Sci. Elec. Arch*. 13 (8). <https://doi.org/10.36560/13820201157>
- Dorigo, A.S., Rosa-Fontana, A.S., Camargo, I.F., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2018. Biological data of stingless bees with potential application in pesticide risk assessments. *Sociobiology*. 65 (4), 777-779. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.2878>
- Dorigo, A. S., Rosa-Fontana, A.S., Soares-Lima, H.M., Galaschi-Teixeira, J.S., Nocelli, R.C.F., Malaspina, I., 2019. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PLoS One*. 14 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213109>
- Dorneles, A.L., Rosa, A.S., Blochtein, B., 2017. Toxicity of organophosphorus pesticides to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigi*.

Apidologie. 48, 612-620. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0502-x>

Dorneles, A.L., Rosa-Fontana, A.S., Santos, C.F., Blochtein, B., 2021. Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. Environ. Pollut. 272, 116414. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116414>

Fagard, R.H., Staessen, J.A., Thijs, L., 1996. Advantages and disadvantages of the meta-analysis approach. J. Hypertens Suppl. S9-S13. <https://doi.org/10.1097/00004872-199609002-00004>

Farder-Gomes, C.F., Fernandes, K.M., Bernardes, R.C., Bastos, D.S.S., Martins, G.F., Serrão, J.E., 2021. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). Sci. Total Environ. 774, 145679. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145679>

Freitas, B.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Medina, L.M., Kleinert, A.M.P., Galetto, L., Nates-Parra, G., Quezada-Euán, J.J.G., 2009. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. Apidologie. 40, 332-346. <https://doi.org/10.1051/apido/2009012>

Friedrich, K., Silveira, G.R., Amazonas, J.C., Gurgel, A.M., Almeida, V.E.S., Sarpa, M., 2021. International regulatory situation of pesticides authorized for use in Brazil: potential for damage to health and environmental impacts. Cad. Saúde Pública. 37 (4). <https://doi.org/10.1590/0102-311X00061820>

Giannini, T.C.; Boff, S.; Cordeiro, G.D.; et al. 2015. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. Apidologie, 46, 209-223. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>

Goulson, D., 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. J. Appl. Ecol. 50, 977-987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science. 347 (6229),

1255957. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>

Grüter, C., 2020. Stingless Bees: Their Behaviour, Ecology and Evolution. Springer Nature. 385p. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-60090-7>

Hedges, L. 1981. Distribution theory for Glass's estimator of effect size and related estimators. J. Educ. Stat. 6, 107–128. <https://doi.org/10.2307/1164588>

Higgins, J.P.T., 2008. Commentary: heterogeneity in meta-analysis should be expected and appropriately quantified. Int. J. Epidemiol. 37, 1158–1160. <https://doi.org/10.1093/ije/dyn204>.

Hua, K., Bureau, D.P., 2012. Exploring the possibility of quantifying the effects of plant protein ingredients in fish feeds using meta-analysis and nutritional model simulation based approaches. Aquaculture. 356–357, 284–301. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.05.003>

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2021. Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola. Available in: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/avaliacao-ambiental>

IPBES, 2016. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. In: Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V.L. & Ngo, H.T. (Eds.), Bonn, Germany: Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, 552 p.

Jacob, C.R.O., Soares, H.M., Carvalho, S. M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2013. Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90, 69-72. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0892-4>

Jacob, C.R.O., Zanardi, O.Z., Malaquias, J.B., Silva, C.A.S., Yamamoto, P.T., 2019. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). Chemosphere. 224, 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.105>

Johnson, R.M., Ellis, M., Mullin, C.A., Frazier, M., 2010. Pesticides and honey bee

- toxicity – USA. *Apidologie*. 41, 312-331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
- Klein, A.M., Vaissei re, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tcharntke, T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B*. 274, 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Kerr, W.E.; Carvalho, G.A.; Nascimento, V.A., 1996. *Abelha Uru u: Biologia, manejo e conserva o*. Minas Gerais: Funda o Acanga . 154p.
- Lima, M.A.P., Martins, G.F., Oliveira, E.E. Guedes, R.N.C., 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J. Comp. Physiol. A*. 202, 733-747. <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1110-3>
- Louren o, C.T., Carvalho, S.M., Malaspina, O., Nocelli, R.C.F., 2012. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 921-924. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0773-x>
- Lundin, O., Rundlof, M., Smith, H.G., Fries, I., Bommarco, R., 2015. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: A systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. *PLoS One*. 10 (8), e0136928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136928>
- Mac as-Mac as, J.O., Tapia-Rivera, J.C., Mora, A., Tapia-Gonz alez, J.M., Contreras-Escare o, F., Petukhova, T., Morfin, N., et al., 2020. *Nosema ceranae* causes cellular immunosuppression and interacts with thiamethoxam to increase mortality in the stingless bee *Melipona colimana*. *Sci*. 10, 17021. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74209-3>
- Macieira, O.J., Hebling-Beraldo, M.J.A., 1989. Laboratory toxicity of insecticides to workers of *Trigona spinipes* (F. 1793) (Hymenoptera, Apidae). *J. Apic. Res.* 28 (1), 3-6. <https://doi.org/10.1080/00218839.1989.11100813>
- Marques, R.D., Lima, M.A.P., Marques, R.D., Bernardes, R.C., 2020. A Spinosad-based formulation reduces the survival and alters the behavior of the stingless bee *Plebeia lucii*. *Neotrop. Entomol.* <https://doi.org/10.1007/s13744-020-00766-x>
- Mel endez-Ram rez, V., Ayala, R., Gonz alez, H.D., 2018. Crop pollination by stingless

bees. In: Vit P. et al. (eds.) Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology. [http://10.1007/978-3-319-61839-5\\_11](http://10.1007/978-3-319-61839-5_11)

Michener, C.D., 2007. The Bees of the World. 2nd Edition, John Hopkins University Press, Baltimore. 953p.

Miotelo, L., Reis, A.L. M., Malaquias, J.B., Malaspina, O., Roat, T.C., 2021. *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. Environ. Pollut. 268, 115770. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115770>

Moraes, S.S., Bautista, A.R., Viana, B.F., 2000. Avaliação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub> e CL<sub>50</sub>) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de contato. A. Soc. Entomol. Brasil. 29 (1). <https://doi.org/10.1590/S0301-80592000000100004>

Morais, C.R., Travençolo, B.A.N., Carvalho, S.M., Beletti, M.E., Santos, V.S.V., Campos, C.F., Campos-Júnior, E.O.C., et al., 2018. Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). Chemosphere. 206, 632-342. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.153>

Moreira, D.R., Gigliolli, A.A.S., Falco, J.R.P., Julio, A.H.F., Volnistem, E.A., Chagas, F., Toledo, V.A.A., et al., 2018. Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). Environ. Toxicol. 33 (4), 463-475. <https://doi.org/10.1002/tox.22533>

Moure, J.S., Melo, G.A.R., Faria Jr, L.R.R., 2012. Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region – online version.

Neff, J.L., Simpson, B.B., 1993. Bees, pollination systems and plant diversity. In: LaSalle, J, Gauld ID, Editors. Hymenoptera and Biodiversity. C.A.B International, Oxon, UK. p. 14316.

Nunes, A., Schmitz, C., Moura, S., Maraschin, M., 2021. The influence of recent Brazilian policy and legislation on increasing bee mortality. Res. Soc. Dev. 10 (4), e36910414157. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14157>

Ollerton, J., Winfree, R., Tarrant, S., 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120, 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>

Ollerton, J., 2017. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48, 353-376. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110316-022919>

Orr, M.C., Hughes, A.C., Chesters, D., Pickering, J., Zhu, C.D., Ascher, J.S., 2020. Global patterns and drivers of bee distribution. *Curr. Biol.* 31, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.10.053>

Orwin, R.G., Boruch, R.F., 1982. RRT meets RDD: statistical strategies for assuring response privacy in telephone surveys. *Public Opin. Q.* 46, 560. <https://doi.org/10.1086/268752>

Otesbelgue, A., Santos, C.F., Blochtein, B., 2018. Queen bee acceptance under threat: Neurotoxic insecticides provoke deep damage in queen-worker relationships. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 166, 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.048>

Padilha, A.C., Piovesan, B., Morais, M.C., Pazini, J. de B., Zotti, M.J., Botton, M., Grützmacher, A.D., 2020. Toxicity of insecticides on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Friese) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Ecotoxicology*. 29, 119-128. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02150-x>

Pedro, S.R.M., 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*. 61 (4), 348-354. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>

Pignati, W.A., Lima, F.A.N. S., Lara, S.S., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H. C., Pignatti, M.G., 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Cien. Saúde Colet.* 22 (10), 3281-3293. <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>

Piovesan, B., Padilha, A.C., Morais, M.C., Botton, M., Grützmacher, A.D., Zotti, M.J., 2020. Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 42472-42480. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10191-7>

Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Downs C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., et al., 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. *Environ Sci Pollut Res.* 22, 68–102.

<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends. Ecol. Evol.* 25 (6), 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>

Potts, S.G., Imperatriz-Fonseca, V.L., Ngo, H.T., Aizen, M.A., Biesmeijer, J.C., Breeze, T.D., Dicks, L.V., et al., 2016. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature.* 540, 220-229. <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., 2020. Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 via oral and topic acute exposure. *Environ. Pollut.* 265, 114313. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114313>

Ramalho, M., 2004. Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. *Acta Bot. Bras.* 18(1), 37-47. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000100005>

Quezada-Euán, J.J.G., Nates-Parra, G., Maués, M.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Roubik, D.W., 2018. Economic and cultural values of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. *Sociobiology.* 65 (4), 534-557. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3447>

Quiroga-Murcia, D.E., Zotti, M.J., Polanía, I.Z., Pech-Pech, E., 2017. Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). *Agron. Colomb.* 35 (3), 340-349. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n3.65447>

Ravaiano, S.V., Barbosa, W.F., Tomé, H.V.V., Campos, L.A.O., Martins, G.F., 2018. Acute and oral exposure to imidacloprid does not affect the number of circulating hemocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* post immune challenge. *Pestic. Biochem. Physiol.* 152, 24-28. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.08.002>

Regan, E.C., Santini, L., Ingwall-King, L., Hoffmann, M., Rondinini, C., Symes, A., Taylor, J., et al., 2015. Global trends in the status of bird and mammal pollinators. *Conserv. Lett.* 8 (6), 397–403. <https://doi.org/10.1111/conl.12162>

Reyes-González, A., Camou-Guerrero, A., del-Val, E., Ramírez, M.I., Porter-Bolland, L., 2020. Biocultural diversity loss: the decline of native stingless bees (Apidae: Meliponini) and local ecological knowledge in Michoacán, Western México. *Hum. Ecol.* 48, 411–422. <https://doi.org/10.1007/s10745-020-00167-z>

Rosa-Fontana, A.S., Dorigo, A.S., Soares-Lima, H.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2020. Is the water supply a key factor in stingless bees' intoxication? *J. Insect. Sci.* 20 (6), 1-4. <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieaa127>

Rosenberg, M.S., Adam, D.C., Gurevitch, J., 2000. *MetaWin: Statistic Software for Meta-Analysis (version 2)*. Sinauer As. ed. Sunderland, Massachusetts.

Roubik, D.W., 1989. *Ecology and natural history of tropical bees*. Cambridge University Press, Cambridge. 514p.

Roubik, D.W., Patiño, J.E.M., 2018. The stingless honey bees (Apidae, Apinae: Meliponini) in Panama and pollination ecology from pollen analysis. In: Vit P., Pedro, S. and Roubik, D. (eds.) *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*. Springer: Cham, p. 47-66.

Sánchez-Bayo, F., Goka, K. 2014. Pesticide residues and bees – A risk assessment. *PLoS One.* 9 (4), e94482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>

Sánchez-Bayo, F.; Wyckhuys, K.A.G., 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.* 232, 8-27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>

Santos, C.F., Otesbelgue, A.; Blochtein, B., 2018. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PLoS One.* 13 (7), e0200286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200286>

Siviter, H., Koricheva, J., Brown, M.J.F., Leadbeater, E., 2018. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *J. Appl. Ecol.* 55 (6).

<https://foi.org/10.1111/1365-2664.13193>

Siviter, H.; Bailes, E.J.; Martin, C.D.; Oliver, T.R.; Koricheval, J.; Leadbeater, E., Brown, M.J., 2021. Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. *Nature*. 596, 389–392. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03787-7>

Slaa, E.J.B., Sánchez-Chaves L.A., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E., 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*. 37, 293-315. <https://doi.org/10.1051/apido:2006022>

Soares, J.M., Jacob, C.R.O., Carvalho, S.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2015. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). *Buul. Environ. Contam. Toxicol.* 94 (6), 675-680. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1488-6>

Tomé, H. V.V., Martins, G.F., Lima, M.A., Campos, L.A.O. Guedes, R.N.C., 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS One*. 7 (6), e38406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038406>

Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Martins, G.F., Guedes, R.N.C., 2015. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere*. 124, 103-109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.038>

Tomé, H.V.V., Ramos, G., Araújo, M.F., Santana, W.C., Santos, G.R., Guedes, R.N., Maciel, C.D., et al., 2017. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. *R. Soc. Open Sci.* 4 (1), 160866. <https://doi.org/10.1098/rsos.160866>

Valdovinos-Núñez, G.R., Quezada-Euán, J.J.G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H., Carmona, A., Sánchez, E.R., 2009. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Entomol. Soc. Am.* 102 (5), 1737-1742. <https://doi.org/10.1603/029.102.0502>

Vanbergen, A.J., 2013. Insect Pollinators Initiative. Threats to an ecosystem service:

pressures on pollinators. *Front Ecol Environ.* 11 (5), 251–259. <https://10.1890/120126>

Van Maele-Fabry, G., Lantin, A.C., Hoet, P., Lison, D., 2011. Residential exposure to pesticides and childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Int.* 37, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.08.016>.

Viechtbauer, W., 2010. Conducting meta-analyses in R with the metafor package. *J. Stat. Softw.* 36 (3), 1-48. <https://doi.org/10.18637/jss.v036.i03>

Villanueva-G., R., Roubik, D.W., Colli-Ucán, W., 2005. Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatán península. *Bee World.* 86 (2), 35-41. <http://10.1080/0005772X.2005.11099651>

Wallace, B.C., Dahabreh, I.J., Trikalinos, T.A., Lau, J., Trow, P., Schmid, C.H., 2012. Closing the gap between methodologists and end-users: R as a computational back-end. *J. Stat. Softw.* 49 (1), 1-15. <https://doi.org/10.18637/JSS.V049.I05>

Zattara, E., Aizen, M.A., 2021. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. *One Earth.* 4 (1), 114. <https://doi.org/10.1101/869784>

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**Table S1.** Data taken from the articles analysed in the meta-analysis. Studies indicated by numbers, authors, type of exposure, life stage, studied species, chemical group, exposure time, number of alive and dead bees, from control group (AC and DC, respectively), as well as value of analysed dose and number of alive and dead bees, from the experimental group (AT and DT, respectively) (Lines 19, 32, 33 and 40 were removed due to problems with data analysis)

Study ID (=dataset)	Authors and year	Type of exposition	Life stage	Species	Pesticide	Category (Chemical group)	Exposition (h) or days*	AC	DC	Total	Dose/concentration	AT	DT	Total
<b>Study 1</b>	<b>Araújo et al. 2019</b>	<b>Oral</b>	<b>Larva</b>	<b><i>Partamona helleri</i></b>	<b>Spinosad</b>	<b>Spinosyn</b>	<b>50 days*</b>	<b>64</b>	<b>14</b>	<b>78</b>	<b>6.53 ng a.i./bee</b>	<b>65</b>	<b>12</b>	<b>77</b>
Study 2	Tomé et al. 2015	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Spinosad	Spinosyn	24	30	0	30	5 ng a.i./bee	28	2	30
Study 3	Botina et al. 2019	Oral	Adult	<i>Partamona helleri</i>	Spinosad	Spinosyn	24	100	0	100	0.72 ppm	90	10	100
Study 4	Marques et al. 2020	Oral	Adult	<i>Plebeia lucii</i>	Spinosad	Spinosyn	72	50	0	50	0.82 ppm	45	5	50
<b>Study 5</b>	<b>Barbosa et al. 2015</b>	<b>Oral</b>	<b>Larva</b>	<b><i>Melipona quadrifasciata</i></b>	<b>Spinosad</b>	<b>Spinosyn</b>	<b>50 days*</b>	<b>88</b>	<b>8</b>	<b>96</b>	<b>0.57 ng a.i./bee</b>	<b>84</b>	<b>12</b>	<b>96</b>
Study 6	Piovesan et al. 2020	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Spinetoram	Spinosyn	48	60	0	60	0.1 ppm	58	2	60
Study 7	Piovesan et al. 2020	Topic	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Spinetoram	Spinosyn	48	58	2	60	1 ng a.i./bee	58	2	60
Study 8	Piovesan et al. 2020	Oral	Adult	<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	Spinetoram	Spinosyn	48	60	0	60	0.1 ppm	58	2	60
Study 9	Piovesan et al. 2020	Topic	Adult	<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	Spinetoram	Spinosyn	48	60	0	60	0.5 ng a.i./bee	54	6	60
Study 10	Soares et al. 2015	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona postica</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	24	60	0	60	1 ppm	58	2	60
Study 11	Soares et al. 2015	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona postica</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	48	60	0	60	1 ppm	56	4	60
Study 12	Soares et al. 2015	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona postica</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	24	60	0	60	5 ng a.i./bee	55	5	60
Study 13	Soares et al. 2015	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona postica</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	48	56	4	60	5 ng a.i./bee	49	11	60
Study 14	Costa et al. 2015	Topic	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	24	28	2	30	2 ppm	21	9	30
Study 15	Costa et al. 2015	Topic	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	48	28	2	30	0.3 ppm	23	7	30
Study 16	Costa et al. 2015	Oral	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	24	28	2	30	0.3 ppm	27	3	30
Study 17	Costa et al. 2015	Oral	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	48	28	2	30	0.3 ppm	21	9	30
Study 18	Tomé et al. 2015	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	24	30	0	30	5 ng a.i./bee	28	2	30
Study 20	Rosa-Fontana et al. 2020	Oral	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Imidacloprid	Neonicotinoid	24	29	1	30	0.00089 ppm	30	0	30
<b>Study 21</b>	<b>Brito et al. 2020</b>	<b>Oral</b>	<b>Adult</b>	<b><i>Melipona quadrifasciata</i></b>	<b>Imidacloprid</b>	<b>Neonicotinoid</b>	<b>168 (7 days*)</b>	<b>33</b>	<b>12</b>	<b>45</b>	<b>0.01 ppm</b>	<b>31</b>	<b>14</b>	<b>45</b>
Study 22	Piovesan et al. 2020	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	48	60	0	60	0.01 ppm	57	3	60
Study 23	Piovesan et al. 2020	Topic	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	48	56	4	60	0.1 ppm	53	7	60

Table S1 (Cont.)

Study ID (=dataset)	Authors and year	Type of exposition	Life stage	Species	Pesticide	Category (Chemical group)	Exposition (h) or days*	AC	DC	Total	Dose	AT	DT	Total
Study 24	Piovesan et al. 2020	Oral	Adult	<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	48	60	0	60	0.1 ppm	56	4	60
Study 25	Piovesan et al. 2020	Topic	Adult	<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	48	60	0	60	0.5 ppm	56	4	60
Study 26	Quiroga-Murcia et al. 2017	Oral	Adult	<i>Tetragonisca angustula</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	48	30	0	30	0.02 ppm	29	1	30
Study 27	Quiroga-Murcia et al. 2017	Topic	Adult	<i>Tetragonisca angustula</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	48	30	0	30	0.01 ppm	30	0	30
Study 28	Quiroga-Murcia et al. 2017	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	48	30	0	30	0.01 ppm	30	0	30
Study 29	Quiroga-Murcia et al. 2017	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	48	30	0	30	0.01 ppm	29	1	30
Study 30	Miotelo et al. 2021	Oral	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	24	30	0	30	0.0125 ppm	26	4	30
Study 31	Moreira et al. 2018	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Thiamethoxam	Neonicotinoid	24	43	2	45	0.05 ppm	39	6	45
Study 34	Boff et al. 2018	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Acetamiprid + alpha cypermethrin	Neonicotinoid + Pyrethroid	48	24	0	24	0.015 + 0.030 ng a.i./bee	20	3	23
Study 35	Del Sarto et al. 2014	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Deltamethrin	Pyrethroid	24	50	0	50	0.01562 mg	33	18	51
Study 36	Del Sarto et al. 2014	Topic	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Deltamethrin	Pyrethroid	24	38	2	40	10 mg	40	0	40
Study 37	Del Sarto et al. 2014	Contact	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Deltamethrin	Pyrethroid	24	50	0	50	0.0031 mg	42	8	50
Study 38	Moraes et al. 2000	Contact	Adult	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Deltamethrin	Pyrethroid	48	20	0	20	0.56 ppm	20	0	20
Study 39	Moraes et al. 2000	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Deltamethrin	Pyrethroid	48	20	0	20	0.56 ppm	18	2	20
Study 41	Macieira & Hebling-Beraldo 1989	Topic	Adult	<i>Trigona spinipes</i>	Cypermethrin	Pyrethroid	24	39	1	40	0.05 µg/bee	29	11	40
Study 42	Del Sarto et al. 2014	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Methamidophos	Organophosphate	24	49	0	49	0.0038 mg	49	0	49
Study 43	Del Sarto et al. 2014	Topic	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Methamidophos	Organophosphate	24	38	2	40	0.031 mg	36	4	40
Study 44	Del Sarto et al. 2014	Contact	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Methamidophos	Organophosphate	24	50	0	50	0.0312 mg	40	10	50

Table S1 (Cont.)

Study ID (=dataset)	Authors and year	Type of exposition	Life stage	Species	Pesticide	Category (Chemical group)	Exposition (h) or days*	AC	DC	Total	Dose	AT	DT	Total
Study 45	Macieira & Hebling-Beraldo 1989	Topic	Adult	<i>Trigona spinipes</i>	Acephate	Organophosphate	24	40	0	40	0.4 µg/bee	25	15	40
Study 46	Moraes et al. 2000	Contact	Adult	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Trichlorfon	Organophosphate	48	20	0	20	0.03 ppm	20	0	20
Study 47	Moraes et al. 2000	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Trichlorfon	Organophosphate	48	20	0	20	0.03 ppm	18	2	20
Study 48	Moraes et al. 2000)	Contact	Adult	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Malathion	Organophosphate	48	20	0	20	0.0025 ppm	20	0	20
Study 49	Moraes et al. 2000	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Malathion	Organophosphate	48	20	0	20	0.0025 ppm	19	1	20
Study 50	Macieira & Hebling-Beraldo 1989	Topic	Adult	<i>Trigona spinipes</i>	Malathion	Organophosphate	24	40	0	40	0.15 ug/bee	31	9	40
Study 51	Jacob et al. 2013	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona postica</i>	Fipronil	Pyrazole	24	60	0	60	0.01 ppm	58	2	60
Study 52	Jacob et al. 2013	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona postica</i>	Fipronil	Pyrazole	24	60	0	60	0.01 ppm	58	2	60
Study 53	Lourenço et al. 2012	Oral	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Fipronil	Pyrazole	24	29	1	30	0.005 ppm	27	3	30
Study 54	Lourenço et al. (2012) (21)	Oral	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Fipronil	Pyrazole	48	27	3	30	0.005 ppm	25	5	30
Study 55	Quiroga-Murcia et al. 2017	Oral	Adult	<i>Tetragonisca angustula</i>	Fipronil	Pyrazole	48	30	0	30	0.01 ppm	29	1	30
Study 56	Quiroga-Murcia et al. 2017	Topic	Adult	<i>Tetragonisca angustula</i>	Fipronil	Pyrazole	48	30	0	30	0.09 ppm	30	0	30
Study 57	Quiroga-Murcia et al. 2017	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	Fipronil	Pyrazole	48	30	0	30	0.01 ppm	30	0	30
Study 58	Quiroga-Murcia et al. 2017	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	Fipronil	Pyrazole	48	30	0	30	0.09 ppm	29	1	30
Study 59	Morais et al. 2018	Topic	Adult	<i>Melipona scutellaris</i>	Fipronil	Pyrazole	24	18	12	30	0.1 ng a.i/bee	17	13	30
Study 60	Farder-Gomes et al. 2021	Oral	Adult	<i>Partamona helleri</i>	Fipronil	Pyrazole	24	40	0	40	0.1 ppm	33	7	40
Study 61	Moraes et al. 2000	Contact	Adult	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Biological insecticide	48	20	0	20	33.6 ppm	15	5	20

Table S1 (Cont.)

Study ID (=dataset)	Authors and year	Type of exposition	Life stage	Species	Pesticide	Category (Chemical group)	Exposition (h) or days*	AC	DC	Total	Dose	AT	DT	Total
Study 62	Moraes et al. 2000	Topic	Adult	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Biological insecticide	48	20	0	20	33.6 ppm	13	7	20
Study 63	Macieira & Hebling-Beraldo 1989	Topic	Adult	<i>Trigona spinipes</i>	Carbaryl Naphthyl Methylcarbamate	Carbamate	24	40	0	40	0.5 µg/bee	25	15	40
Study 64	Macieira & Hebling-Beraldo 1989	Topic	Adult	<i>Trigona spinipes</i>	Methomyl	Carbamate	24	40	0	40	0.1 µg/bee	31	9	40
<b>Study 65</b>	<b>Dorigo et al. 2019</b>	<b>Oral</b>	<b>Larva</b>	<b><i>Melipona scutellaris</i></b>	<b>Dimethoate</b>	<b>Organophosphate</b>	<b>144 (6 days*)</b>	<b>41</b>	<b>19</b>	<b>60</b>	<b>2.125 ng a.i/bee</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>60</b>
Study 66	Diniz et al 2020	Contact	Adult	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Acephate	Organophosphate	24	44	1	45	100 ppm	30	15	45
Study 67	Diniz et al 2020	Contact	Adult	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Acephate	Organophosphate	48	43	1	44	100 ppm	29	1	30
Study 68	Diniz et al 2020	Contact	Adult	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Acephate	Organophosphate	72	43	0	43	100 ppm	27	2	29
Study 69	Diniz et al 2020	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Acephate	Organophosphate	24	44	1	45	5 ppm	33	12	45
Study 70	Diniz et al 2020	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Acephate	Organophosphate	48	44	0	44	5 ppm	31	2	33
Study 71	Diniz et al 2020	Oral	Adult	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Acephate	Organophosphate	72	44	0	44	5 ppm	27	4	31
Study 72	Del Sarto et al. 2014	Contact	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Abamectin	Avermectin	24	50	0	50	0.0003 mg	50	0	50
Study 73	Del Sarto et al. 2014	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Abamectin	Avermectin	24	51	0	51	0.0011 mg	53	0	53
Study 74	Del Sarto et al. 2014	Topic	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Abamectin	Avermectin	24	39	1	40	31.25 mg a.i/bee	40	0	40
Study 75	Piovesan et al. 2020	Oral	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Abamectin	Avermectin	48	60	0	60	2 ppm	56	4	60
Study 76	Piovesan et al. 2020	Topic	Adult	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Abamectin	Avermectin	48	58	2	60	1 ng a.i/bee	58	2	60
Study 77	Piovesan et al. 2020	Oral	Adult	<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	Abamectin	Avermectin	48	60	0	60	0.1 ppm	59	1	60
Study 78	Piovesan et al. 2020	Topic	Adult	<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	Abamectin	Avermectin	48	60	0	60	0.25 ng a.i/bee	55	5	60
Study 79	Macieira & Hebling-Beraldo 1989	Topic	Adult	<i>Trigona spinipes</i>	Endosulfan	Organochlorine	24	40	0	40	0.15 µg/bee	26	14	40
<b>Study 80</b>	<b>Barbosa et al. 2015</b>	<b>Oral</b>	<b>Larva</b>	<b><i>Melipona quadrifasciata</i></b>	<b>Azadirachtin</b>	Biological insecticide	<b>50 days*</b>	<b>85</b>	<b>11</b>	<b>96</b>	<b>42 ng a.i/bee</b>	<b>87</b>	<b>9</b>	<b>96</b>
Study 81	Dorneles et al. 2021	Oral	Larva	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Chlorpyrifos	Organophosphate	44 days*	81	9	90	16.1 ng a.i/bee	53	37	90

Table S1 (Cont.)

Study ID (=dataset)	Authors and year	Type of exposition	Life stage	Species	Pesticide	Category (Chemical group)	Exposition (h) or days*	AC	DC	Total	Dose	AT	DT	Total
Study 82	Chibee et al. 2021	Contact	Adult	<i>Melipona bocandei</i>	Cypermethrin	Pyrethroid	24	30	0	30	25 ppm	29	1	30
Study 83	Chibee et al. 2021	Contact	Adult	<i>Meliponula bocandei</i>	Cypermethrin	Pyrethroid	48	30	0	30	25 ppm	29	1	30
Study 84	Chibee et al. 2021	Contact	Adult	<i>Meliponula bocandei</i>	Cypermethrin	Pyrethroid	72	30	0	30	25 ppm	29	1	30
Study 85	Chibee et al. 2021	Contact	Adult	<i>Meliponula bocandei</i>	Cypermethrin	Pyrethroid	96	29	1	30	25 ppm	26	4	30

Bold lines - Chronic studies  
AC/DC – Alive/dead control  
AT/DT – Alive/dead treatment

### **CAPÍTULO 3. A DOMINÂNCIA DE *APIS MELLIFERA* EM ÁREAS DE CULTIVO DO CAFÉ NO NORTE DO PARANÁ**

#### **RESUMO**

Os polinizadores contribuem para um aumento na produção dos principais cultivos agrícolas mundiais. Dentre estes cultivos está o café, pertencente ao gênero *Coffea* e à família Rubiaceae e que, apesar de ser uma planta autofértil, tem um aumento na quantidade e peso dos grãos produzidos, quando visitada por insetos polinizadores. Esse estudo teve o objetivo de avaliar a abundância e riqueza de espécies de abelhas visitantes de flores do cafeeiro em áreas de cultivo na região norte do estado do Paraná. As amostragens ocorreram em cinco áreas de cultivo de café e foram realizadas por duas pessoas, simultaneamente. Os insetos visitantes das flores do café foram coletados com auxílio de rede entomológica e mortos para posterior identificação em laboratório. Foram coletadas abelhas da espécie *Apis mellifera*, 10 espécies de abelhas-sem-ferrão (Meliponini), além de abelhas solitárias. Houve elevada dominância de *A. mellifera* (62% a 91%) nas cinco áreas amostradas. A abundância de abelhas amostradas nas áreas variou de 318 a 3644 indivíduos. A riqueza de Meliponini variou de duas a oito espécies por área e a abundância relativa do grupo por área variou de menos de 2% a 34,9%. Sugere-se que fatores como a perda de vegetação nativa e a presença de *A. mellifera* respondam, pelo menos em parte, pela baixa riqueza e abundância de abelhas-sem-ferrão na maioria das áreas.

**Palavras-chave:** Meliponini, polinização; cultivo agrícola

## INTRODUÇÃO

Os polinizadores, em especial as abelhas, são componentes essenciais no funcionamento dos ecossistemas terrestres mundiais (IMPERATRIZ-FONSECA e NUNES-SILVA, 2010; RICKETTS et al., 2008). Considerando o volume da produção global de alimentos, 35% correspondem a cultivos que dependem da polinização animal, principalmente por abelhas. Enquanto, mundialmente, houve um aumento na dependência da agricultura por polinizadores, devido ao aumento desproporcional na área cultivada com plantações dependentes deles para a polinização (AIZEN et al., 2008), o declínio nas populações de insetos e outros polinizadores é hoje uma realidade (LEBUHN et al., 2012; DICKS et al., 2021; ZATTARA e AIZEN, 2021).

O desenvolvimento de frutos de muitas espécies vegetais depende da eficiência da ação de polinizadores (D'ÁVILA e MARCHINI, 2005). Um estudo de meta-análise, revelou resultados de associações positivas entre frutificação e visitação de flores por insetos, em 41 sistemas de cultivo em todo o mundo, incluindo amêndoas, algodão e café (GARIBALDI et al., 2013).

O café, importante *commodity* (= mercadoria) mundial, é uma planta que tem sua origem no continente africano, a qual teve sua introdução no Brasil, provavelmente, no ano de 1727 (PRIORI et al., 2012). Atualmente, o Brasil destaca-se como o maior exportador de café no mercado mundial e o segundo maior, entre os países consumidores da bebida (ABIC, 2021). Além disso, o país é o maior produtor de café arábica e o segundo maior produtor de café robusta, em nível global (EMBRAPA, 2021b). A área de produção cafeeira no Brasil abrange atualmente 1,82 milhão de hectares (EMBRAPA, 2021a). O estado do Paraná é atualmente, o sexto maior produtor de café do Brasil (EMBRAPA, 2020) e a região norte do estado é a que possui o maior número de unidades produtivas (IDR, 2022).

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e gênero *Coffea*, o qual possui mais de 90 espécies descritas (SOUZA et al., 2004). As duas principais espécies plantadas no Brasil são o arábica *Coffea arabica* L. (80% da área) e o conilon, ou robusta *Coffea canephora* Pierre (BRASIL, 2018). As plantas apresentam floração sincrônica, ou seja, todas as plantas de café em uma dada extensão florescem simultaneamente (MELO e SOUSA, 2011; FERRAZ-SILVA et al., 2020), com flores durando em média três dias, da abertura até o murchamento (MALERBO-SOUZA et al., 2003).

Há na literatura, diversos estudos sobre visitantes florais em cafeeiros, principalmente abelhas da espécie *Apis mellifera* L., que se mostram como as mais frequentes (MALERBO-SOUZA et al., 2003; RICKETTS, 2004; D'ÁVILLA e MARCHINI, 2005; VERGARA e BADANO, 2009; MALERBO-SOUZA e HALAK, 2012; TEIXEIRA, 2019; FERRAZ-SILVA et al., 2020). Além de *A. mellifera*, espécies de abelhas nativas também são encontradas em cultivos de café, como *Trigona spinipes* Fabricius, 1793 (Hymenoptera, Apidae) e *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae) (MALERBO-SOUZA et al., 2003; MALERBO-SOUZA e HALAK, 2012) entre outras espécies de abelhas-sem-ferrão (RICKETTS, 2004; VERGARA e BADANO, 2009).

Apesar de ser uma planta autofértil, a polinização dos cafeeiros por insetos, está ligada a um aumento na quantidade (ROUBIK, 2002; MALERBO-SOUZA et al., 2003; BOREUX, et al., 2013; MALERBO-SOUZA e HALAK, 2012; TEIXEIRA, 2019; FERRAZ-SILVA et al., 2020) e peso dos grãos produzidos (ROUBIK, 2002; MALERBO-SOUZA e HALAK, 2012; Teixeira, 2019). No estudo de Malerbo-Souza e Halak (2012), constatou-se que a ausência dos insetos visitantes florais, diminuiu em 55,25% a produção de grãos de café. Por outro lado, no tratamento que recebeu

visitantes florais, o peso médio dos grãos de café foi significativamente maior (MALERBO-SOUZA e HALAK, 2012).

Adicionalmente, as plantas do café são beneficiadas quando cultivadas em áreas que abrigam polinizadores (ROUBIK, 2002) e remanescentes florestais aumentam a atividade dos polinizadores em áreas agrícolas ao redor (RICKETTS, 2004). De Marco Jr. e Coelho (2004), em estudos realizados em cafezais no Brasil, constataram que fazendas próximas a fragmentos florestais aumentaram em 14,6% a produção, o que poderia estar relacionado com a presença de polinizadores do entorno.

O avanço na agricultura cafeeira no estado do Paraná ao longo do século XIX acarretou a devastação de grande parte da vegetação da região norte (PRIORI et al., 2012). No passado, o estado era recoberto, em quase sua totalidade (98%), por diferentes tipos de formação vegetal da Mata Atlântica e ecossistemas associados (MORELLATTO e HADDAD, 2000; OLIVEIRA-FILHO e FONTES, 2000). Em apenas um século (1890 a 1990) o estado do Paraná reduziu sua cobertura florestal de 16.762.600 hectares, ou 83,41% de seu território, para cerca de 872.600 hectares, ou 5,20% de seu território (GUBERT-FILHO, 2010).

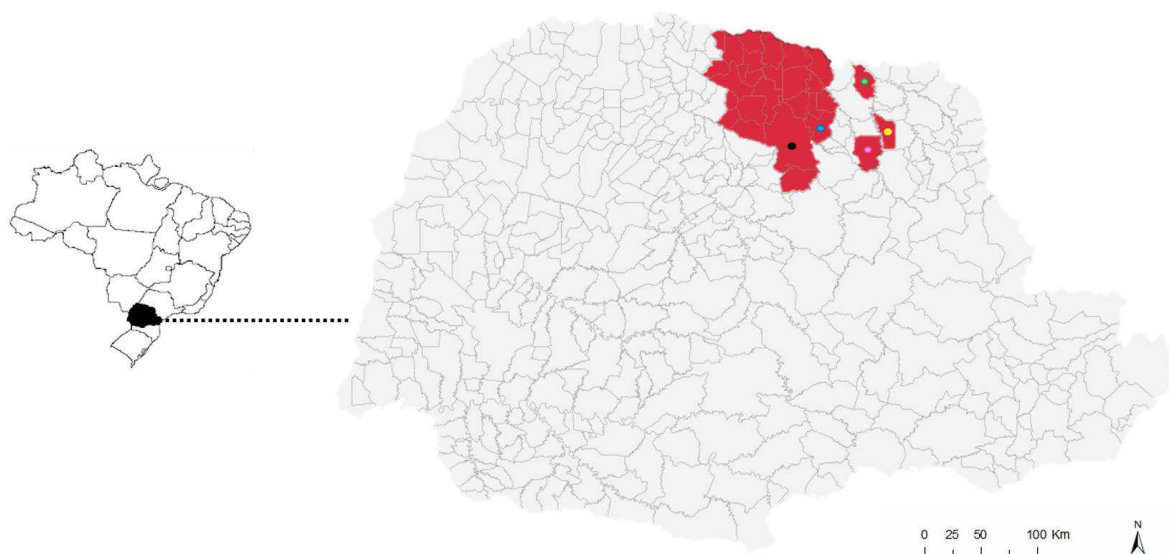
Assim, considerando o norte do estado do Paraná como importante produtor de café e as abelhas como importantes polinizadores de diversas culturas agrícolas, inclusive de flores do cafeeiro, o presente estudo teve como principal objetivo, avaliar a riqueza e abundância de abelhas visitantes florais de cultivos de café localizados na região norte do Estado do Paraná.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi conduzido em cinco áreas de cultivo comercial,

localizadas no norte do estado do Paraná, região sul do Brasil. As áreas estavam localizadas em cinco diferentes cidades do estado: Assaí, Congonhinhas (CG), Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Santa Mariana e Ribeirão do Pinhal (RP).

As coletas realizadas no IAPAR foram as únicas realizadas em área urbana, localizada na cidade de Londrina. As outras áreas localizam-se a alguns quilômetros de distância (Figura 1). Assaí (-23.376958738494427, -50.842257182354146) localiza-se a aproximadamente 30 km de Londrina e as coletas ocorreram em uma área rural de 32 ha. Congonhinhas (-23.550067309826794, -50.55309303305957) localiza-se a 65 km de Londrina e as coletas foram realizadas em uma área rural de 52 ha. A cidade de Santa Mariana (-23.1499367, -50.5199587) dista cerca de 68 km de Londrina e o local onde foram feitas as coletas, têm uma área plantada de café de 180 ha. Ribeirão do Pinhal (-23.40741085760725, -50.35966964343185), a cidade mais distante dentre os pontos de coleta, está a cerca de 80 km de distância de Londrina e as coletas ocorreram em uma propriedade com 40 ha de plantação de café.



**Figura 1.** Localização das cinco cidades na região norte do estado do Paraná, onde foram realizadas as coletas de abelhas em plantações de café: IAPAR (Londrina – preto), Assaí (azul), Congonhinhas (rosa), Santa Mariana (verde) e Ribeirão do Pinhal (amarelo).

Na época de floração dos cafeeiros, foram realizadas as coletas dos visitantes florais. As coletas ocorreram em 11/09/2019 no IAPAR, 12/09/2019 em Assaí e Congonhinhas, 17/10/2020 em Santa Mariana e 20/09/2021 em Ribeirão do Pinhal. Os visitantes florais foram coletados por meio de coletas ativas, com auxílio de rede entomológica.

O horário de amostragem ocorreu das 06:00 às 14:00 horas em Assaí, entre 07:00 e 14:00 horas em Congonhinhas e IAPAR; e entre 07:00 e 13:00 horas em Santa Mariana e Ribeirão do Pinhal. A amostragem foi realizada por duas pessoas simultaneamente, durante períodos de 15 minutos, com intervalos de 15 minutos entre cada hora de coleta. As duplas de coletores alternavam-se entre os períodos de 15 minutos de coleta, de forma que não ficassem intervalos de tempo sem amostragens. Os intervalos nos horários de coleta foram agrupados a cada uma hora, de forma que se referem ao início do horário, mais 1 minuto, por exemplo, das 08:00 às 09:00 h, refere-se ao início em 08:00 h e término em 08:59 h. Os indivíduos coletados foram anestesiados e mortos em câmara mortífera contendo éter e posteriormente, acondicionados em tubos Falcon contendo álcool 100%, identificados com informações sobre a coleta (área, data, coletor e horário). Após as coletas nas áreas, as abelhas foram levadas ao Laboratório de Genética e Ecologia Animal (LAGEA), onde foram identificados.

## **RESULTADOS**

Ao todo, nas cinco áreas amostradas foram coletadas abelhas da espécie *A. mellifera* espécies do grupo de abelhas-sem-ferrão (Meliponini) e espécies de abelhas solitárias, além de outras ordens de insetos. No total, foram coletadas dez

espécies de Meliponini e dentre estas, *T. spinipes* foi a única encontrada em todas as áreas amostradas (Tabela 1).

Assaí foi a área com maior abundância de indivíduos coletados, seguida por IAPAR, Santa Mariana (SM), Congonhinhas (CG) e Ribeirão do Pinhal (RP) (Tabela 1). Adicionalmente, Assaí também foi a área que apresentou maior riqueza de espécies coletadas, com nove, das onze espécies identificadas no estudo, além de indivíduos da tribo Exomalopsini e da família Halictidae. Esta área também teve a maior abundância, totalizando 3922 indivíduos coletados (Tabela 1).

Considerando Meliponini, SM foi a área com menor riqueza de espécies da tribo, com apenas duas espécies registradas nas flores do cafezal (Tabela 1). Contudo, em comparação com as outras áreas, SM apresentou o maior número de indivíduos da família Halictidae durante a coleta. RP foi o local de coleta que apresentou a menor abundância de abelhas nas flores (331 indivíduos). No caso de CG, esta foi a única área em que indivíduos de *Bombus (F.) morio* (Swederus, 1787) (Hymenoptera, Apidae) e *Xylocopa* sp. (Hymenoptera, Apidae) foram coletados. Considerando-se as abelhas-sem-ferrão, três espécies, *Nannotrigona testaceicornis* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera, Apidae), *Plebeia droryana* (Friese, 1900) (Hymenoptera, Apidae) e *Tetragona clavipes* (Fabricius, 1804) (Hymenoptera, Apidae), tiveram ocorrências exclusivas a uma única área de estudo (Tabela 1).

Excluindo-se *A. mellifera*, os indivíduos da família Halictidae representaram 59,8% das abelhas coletadas em SM. Em CG, ocorreu a maior abundância de *Schwarziana quadripunctata* (Lepeletier, 1836) (Hymenoptera, Apidae), com 109 indivíduos coletados ao todo. Esta espécie foi encontrada apenas em CG e RP, porém neste último local, sua abundância foi baixa (n = 5 indivíduos) (Tabela 1).

Entre as espécies de Meliponini, *T. angustula* foi a mais abundante em Assaí

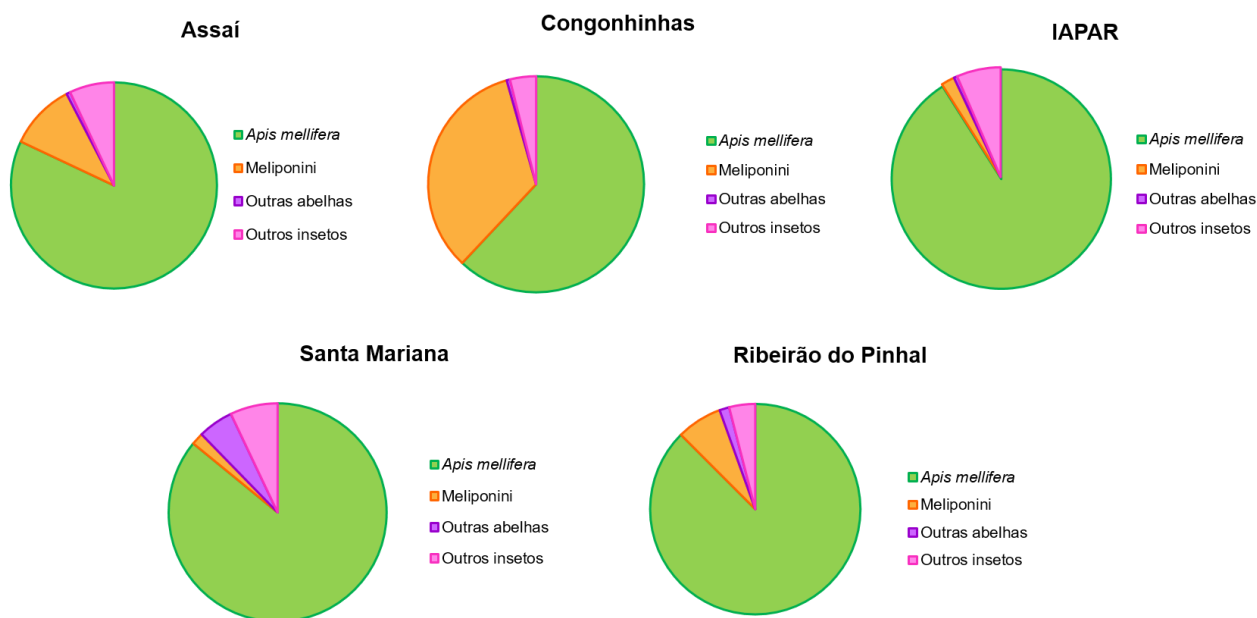
e IAPAR. Em CG, SM e RP, *T. spinipes* foi a espécie de abelha-sem-ferrão mais abundante. Porém, em todas as áreas, entre as abelhas coletadas, houve predominância da espécie *A. mellifera*. Levando em consideração apenas as espécies de abelhas coletadas, ou seja, excluindo-se os outros insetos da análise, *A. mellifera* representou 97,2% das abelhas coletadas no IAPAR, 92,4% em SM, 91,2% em RP, 88,2% em Assaí e 64,5% em CG (Tabela 1).

**Tabela 1.** Abundância e composição de insetos coletados nas amostragens realizadas em flores de cafeeiros localizados em cinco diferentes áreas da região norte do Estado do Paraná: Assaí, Congonhinhas (CG), IAPAR, Santa Mariana (SM) e Ribeirão do Pinhal (RP).

<b>Espécies</b>	<b>ASSAÍ</b>	<b>CG</b>	<b>IAPAR</b>	<b>SM</b>	<b>RP</b>	<b>TOTAL</b>
<i>Apis mellifera</i> L. 1758	3215	559	1251	997	288	6310
<i>Leurotrigona muelleri</i> (Friese, 1900)	2	2	-	-	-	4
<i>Nannotrigona testaceicornis</i> (Lepelletier, 1836)	-	-	-	-	1	1
<i>Plebeia droryana</i> (Friese, 1900)	6	-	-	-	-	6
<i>Plebeia</i> sp1	10	1	-	-	-	11
<i>Scaura latitarsis</i> (Friese, 1900)	46	-	1	-	-	47
<i>Schwarziana quadripunctata</i> (Lepelletier, 1836)	-	109	-	-	5	114
<i>Tetragona clavipes</i> (Fabricius, 1804)	9	-	-	-	-	9
<i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)	188	41	25	4	-	258
<i>Trigona hyalinata</i> (Lepelletier, 1836)	2	7	-	-	-	9
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	147	143	3	17	17	327
<b>Total Tribo Meliponini</b>	<b>410</b>	<b>303</b>	<b>29</b>	<b>21</b>	<b>23</b>	<b>786</b>
<i>Bombus</i> (F.) <i>morio</i> (Swederus, 1787)	-	1	-	-	-	1
<i>Xylocopa</i> sp.	-	1	-	-	-	1
Tribo Exomalopsini	7	-	1	12	3	23
Família Andrenidae	-	-	-	-	2	2
Família Halictidae	12	3	6	49	2	72
<b>Total outras abelhas exceto <i>Apis mellifera</i></b>	<b>429</b>	<b>308</b>	<b>36</b>	<b>82</b>	<b>30</b>	<b>885</b>
Outros insetos	278	35	89	82	13	497
<b>TOTAL INDIVÍDUOS COLETADOS</b>	<b>3922</b>	<b>902</b>	<b>1376</b>	<b>1161</b>	<b>331</b>	<b>7692</b>

Dentre todos os insetos coletados, em todas as áreas de amostragem *A. mellifera* foi a espécie mais abundante, representando 62% do total coletado em CG, 82% em Assaí, 85,9% em SM, 87,5% em RP e 91% no IAPAR (Figura 2). Em CG e Assaí, houve maior abundância de Meliponini em relação às outras áreas, porém,

esse valor representou apenas 33,6% e 10,4%, respectivamente (Tabela 1; Figura 2).



**Figura 2.** Abundância de abelhas e outros insetos coletados nas amostragens realizadas em flores de cafeeiros localizados em cinco áreas na região norte do estado do Paraná: Assaí, Congonhinhas (CG), IAPAR, Santa Mariana (SM) e Ribeirão do Pinhal (RP).

No geral, em todas as áreas amostradas, a atividade de *A. mellifera* e de todas as espécies de Meliponini ocorreu durante todo o período de amostragem, com maior abundância de indivíduos de *A. mellifera* coletados, em todos os horários de tempo observados. As outras espécies de abelhas foram coletadas com maior abundância entre as 09:00 e 11:00 horas da manhã.

## DISCUSSÃO

É relevante mencionar que a grande abundância de *A. mellifera* observada em todas as áreas do presente estudo, também foi constatada em outros estudos

em que avaliaram a polinização do cafeeiro. No estudo de Malerbo-Souza et al. (2003), *A. mellifera* representou mais de 80% dos indivíduos coletados em *C. arabica*. Certamente, algumas características biológicas de *A. mellifera*, como ser uma espécie eussocial, que constitui colônias perenes com dezenas milhares de indivíduos e apresentar um eficiente sistema de comunicação para o recrutamento de operárias do mesmo ninho para fontes de recursos (MICHENER, 1974), podem ser atribuídas ao sucesso da de colonização por esta abelha em regiões do mundo onde ela foi introduzida.

Contudo, outras possíveis explicações para a maior abundância de *A. mellifera* têm sido fornecidas por diferentes autores. Por exemplo, no caso de populações selvagens da abelha africanizada *A. mellifera*, a elevada abundância em alguns cultivos, tem sido atribuída também à sua capacidade de persistir em paisagens agrícolas (CHACOFF e AIZEN, 2006). Neste contexto, em condições ambientais favoráveis, enxames de *A. mellifera* podem se reproduzir e se instalar na natureza, tornando-se um componente da fauna local, com danos potenciais a espécies nativas de abelhas (AIZEN et al., 2020).

Espécies de abelhas-sem-ferrão representaram a segunda maior abundância de abelhas em flores do café em diversos estudos (RICKETTS, 2004; MALERBO-SOUZA e HALAK, 2012; FERRAZ e SILVA, 2020). Assim como no presente trabalho, em alguns estudos, *T. spinipes* foi a segunda espécie mais abundante coletada (MALERBO-SOUZA e HALAK, 2012; FERRAZ e SILVA, 2020), porém, com uma abundância muito menor em relação à *A. mellifera*.

Estudos realizados nas últimas décadas, que relataram declínios nas populações de abelhas no mundo todo, relacionaram a redução da vegetação nativa como uma das causas para esse declínio (KREMEN et al., 2002; FREITAS et al.,

2009, POTTS et al., 2010; RHODES, 2018). Assim, a perda da cobertura vegetal da região norte do Paraná, é uma das possíveis causas para a baixa abundância e riqueza de abelhas nativas, dentre as quais as abelhas-sem-ferrão. Tanto para espécies solitárias que nidificam no solo, as quais representam 90% das espécies de abelhas (DANFORTH et al., 2019), quanto para abelhas que nidificam em ocos de troncos de árvores, como é o caso das abelhas-sem-ferrão (COTORPASSI-LAURINO et al., 2009), a perda da cobertura vegetal tem impactos negativos sobre a nidificação (CANE, 1991; FREITAS et al., 2009). Além disto, a remoção da vegetação nativa afeta as populações de abelhas pela perda/alteração dos recursos florais (FREITAS et al., 2009).

No Paraná, a alteração na paisagem ocorreu bruscamente durante o período de 1890 a 1990, reduzindo a cobertura vegetal do estado para 5,2% do original (GUBERT-FILHO, 2010). Tal fato pode ter contribuído para a diminuição de colônias de abelhas-sem-ferrão, que antes habitavam esses locais. Atualmente, a região norte do estado tem uma paisagem predominantemente agrícola, com monoculturas como milho, trigo e soja (PARANÁ, 2022).

As diferenças encontradas na riqueza e abundância de Meliponini em algumas áreas como Assaí e CG quando comparadas às áreas do IAPAR, SM e RP poderiam estar relacionadas aos impactos que o desmatamento causou no estado e na atual paisagem agrícola regional. Como destacado, a maior parte das abelhas-sem-ferrão nidifica em ocos de árvores (COTORPASSI-LAURINO et al., 2009), de modo que, a conservação de fragmentos e matas possibilita o estabelecimento de populações dessas abelhas (IMPERATRIZ-FONSECA e NUNES-SILVA, 2010). Contudo, para confirmar esta hipótese, são necessárias análises adicionais, avaliando os possíveis efeitos da paisagem em relação aos resultados encontrados.

De forma similar, para explicar a abundância de Halictidae em SM, área de cultivo que mostrou a menor riqueza de espécies de abelhas, mas onde Halictidae representou cerca de 60% das abelhas nas flores de *C. arabica*, quando *A. mellifera* foi excluída da amostra, análises adicionais seriam necessárias. Considerando-se que estas abelhas constroem seus ninhos no solo, informações como a disponibilidade de solos mais adequados próximos a área de cultivo e sobre o contexto da paisagem são essenciais neste caso para inferências consistentes. Muitas vezes, as espécies que constroem ninhos no solo, nidificam próximo às áreas de lavoura, atuando como polinizadores eficientes de cultivos agrícolas nas proximidades (CHRISTMANN, 2022).

No caso de Meliponini, foi demonstrado que a abundância de indivíduos e riqueza de espécies se mostraram positivamente relacionadas à cobertura florestal (BROSI, 2009), a qual, um modo geral, na região norte do estado do Paraná é bastante escassa, restando atualmente menos de 4% da cobertura vegetal nativa (TOREZAN, 2002). Assim, a falta de cobertura vegetal na região pode estar relacionada à baixa diversidade de espécies de abelhas encontrada no presente estudo.

Em lavouras de café, também foi demonstrado que fragmentos de florestas tropicais aumentam a atividade de polinizadores em lavouras próximas a estes (RICKETTS, 2004). Especificamente, considerando-se apenas Meliponini e *A. mellifera*, este último autor observou que a riqueza de espécies, a taxa geral de visitação e a taxa de deposição de pólen foram significativamente maiores em locais dentro de aproximadamente 100 m de fragmentos florestais do que em locais mais distantes (distância máxima de 1,6 km). Assim, a distância entre o ninho e a fonte alimento constitui um outro fator para a sobrevivência e manutenção de abelhas

como visitantes e polinizadores dos plantios.

Longas distâncias entre ninhos e plantas reduzem os serviços de polinização (ROULSTON e GOODELL, 2011), principalmente por espécies de abelhas pequenas, como *T. spinipes* e *T. angustula*, que têm raio de voo de até 850 m (GRÜTER, 2020) e foram as espécies de Meliponini mais frequentemente encontradas no presente estudo).

Dessa forma, paisagem tem grande influência na sobrevivência da fauna e áreas de remanescentes florestais são imprescindíveis para a manutenção de comunidades de abelhas e outros himenópteros (GOBATTO, 2021). Além disso, a influência positiva na heterogeneidade da paisagem sobre a riqueza e abundância de alguns grupos de abelhas em paisagens associadas a cultivos de café foi recentemente demonstrada (CARNEIRO et al., 2021). Assaí foi a área com maior abundância de indivíduos e riqueza de espécies coletadas e esse resultado pode estar relacionado à paisagem do local, que possui cultivos de árvores frutíferas. Tal característica pode favorecer a presença de abelhas na região e conseqüentemente, aumentar a abundância e riqueza de indivíduos visitando flores de cultivos próximos. Isso porque, as plantas do café são beneficiadas quando cultivadas em áreas que abrigam polinizadores (ROUBIK, 2002).

Além da substituição da cobertura vegetal nativa por monoculturas ser uma condição que reduz a diversidade de plantas nativas que são utilizadas como fontes de recursos tróficos para as abelhas, muitas vezes com impactos negativos sobre a fauna nativa (FREITAS et al., 2009; FAITA et al., 2021), o uso de agrotóxicos associados a extensas áreas agrícolas é outro fator que coloca em risco as populações de abelhas no mundo todo (POTTS et al., 2010; GOULSON et al., 2015; FAITA et al., 2021). Além disso, herbicidas usados em cultivos agrícolas para o

controle de plantas invasoras, não desejáveis ao agricultor, podem impactar diminuindo as fontes de recursos às abelhas (GOULSON et al., 2015).

Estudos relatam sobre os efeitos subletais de diversos tipos de agrotóxicos, em algumas das espécies de abelhas-sem-ferrão encontradas no presente trabalho. Em abelhas da espécie *T. angustula* por exemplo, foram observadas alterações no comportamento, locomoção e atividade enzimática de abelhas sublemtidas a diferentes tipos de agrotóxicos (JACOB et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020; LEITE et al., 2021). Da mesma forma, em *P. droryana* e *N. testaceicornis* foram relatadas alterações no comportamento de abelhas expostas à agrotóxicos (SANTOS et al., 2016; OTESBELGUE, et al., 2018; MATOS et al., 2021). Tais alterações podem prejudicar as abelhas individualmente, interferindo na atividade de forrageio e conseqüentemente, impactar toda a colônia (MORAIS et al., 2018; FARDER-GOMES et al., 2021).

Dessa forma, o uso de agrotóxicos poderia ser um outro fator que explica a baixa abundância das abelhas-sem-ferrão nas áreas de cultivo convencional de café amostradas no presente trabalho.

Considerando-se que a região onde o presente estudo foi conduzido caracteriza-se por ser ocupada por extensas matrizes de monoculturas como trigo, milho e soja, com uso recorrente de agrotóxicos no manejo de pragas; e que nas áreas de cultivo de café amostras o uso de agrotóxicos é uma prática regular, é esperado também, um impacto destes produtos químicos sobre a fauna de abelhas local. Além disso, no caso de Meliponini, os efeitos de agrotóxicos podem ser ainda mais impactantes, uma vez que, este grupo de abelhas tem se mostrado mais sensível aos efeitos de diversos agrotóxicos em comparação com *A. mellifera* (VALDOVIÑOS-NÚÑEZ et al., 2009; ARENA e SGOLASTRA, 2014).

Estudos futuros com enfoque nos efeitos da paisagem sobre a fauna de abelhas visitantes de cultivos agrícolas no norte do estado do Paraná são necessários e urgentes, a fim de se entender de que forma a fragmentação de habitats está influenciando na manutenção e sobrevivência de abelhas nativas sem ferrão, importantes polinizadoras de plantas nativas e cultivadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIC – Associação Brasileira da Indústria de Café. **O café brasileiro na atualidade**. Disponível em <https://www.abic.com.br/tudo-de-cafe/o-cafe-brasileiro-na-atualidade/#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20o%20maior,h%C3%A1%20mais%20de%20150%20anos>. Acessado em: 10 jan. 2022.

AIZEN, M. A., GARIBALDI, L. A., CUNNINGHAM, S. A., KLEIN, A. M. Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency. **Current Biology**, p.18, n.20, p.1572-1575, 2008.

AIZEN, M.A.; ARBETMANA, M. P., CHACOFF, N. P., et al. Invasive bees and their impact on agriculture. Chapter 2. **Advances in Ecological Research**, v.63, p.49-92, 2020.

ARENA, M., SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, v. 23, n.3, p.324-34, 2014.

BOREUX, V., KUSHALAPPA, C. G., VAAST, P., GHAZOUL, J. Interactive effects among ecosystem services and management practices on crop production: Pollination in coffee agroforestry systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.21, p.8387-8392. 2013.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Café no Brasil**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/cafe/cafeicultura-brasileira>. Acessado em: 10 jan. 2022. 2018.

- BROSI, B. J. The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. **Forest Ecology and Management**. 258,1830–1837. 2009.
- CANE, J. H. Soils of ground-nesting bees (Hymenoptera: Apoidea): texture, moisture, cell depth and climate. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v.64, n.4, p. p.406-413, 1991.
- CARNEIRO, L. S., AGUAR, W. M., PRIANTE, C. F., et al.. The interplay between thematic resolution, forest cover, and heterogeneity for explaining euglossini bees community in an agricultural landscape. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v.9, 628319, 2021.
- CHRISTMANN, S. Regard and protect ground-nesting pollinators as part of soil biodiversity. **Ecological Applications**, e2564. 2022.
- CHACOFF, N. P., AIZEN, M. A. Edge effects on flower-visiting insects in grapefruit plantations bordering premontane subtropical forest. **Journal of Applied Ecology**, v.43, p.18–27, 2006.
- CORTOPASSI-LAURINO, M., ARAUJO, D. A., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. 2009. **Árvores neotropicais, recursos importantes para a nidificação de abelhas-sem-ferrão (Apidae, Meliponini)**. Disponível em: [www.apacame.org.br/mensagemdoce/100/artigo4.htm](http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/100/artigo4.htm) Acessado em: 15 mar. 2022.
- DANFORTH, B. N., MINCKLEY, R. L., NEFF, J. L. **The solitary bees: biology, evolution, conservation**. New Jersey: Princeton University Press. 2019.
- D'ÁVILLA, M., MARCHINI, L. M. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. **Boletim de Indústria Animal**, v.62, n.1, p.79-90, 2005.
- DE MARCO JR. P., COELHO, F. M. Services performed by the ecosystem: forest remnants influence agricultural cultures pollination and production. **Biodiversity and Conservation**, v.13, p.1245-1255. 2004.

DICKS, L. V., BREEZE, T. D., NGO, H. T. et al. A global-scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. **Nature Ecology & Evolution**, v.5, p.1453–1461, 2021.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção dos cafés do Brasil atinge 61,62 milhões de sacas de 60 kg em 2020, volume 25% maior que 2019.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/56084554/producao-dos-cafes-do-brasil-atinge-6162-milhoes-de-sacas-de-60kg-em-2020-volume-25-maior-que-2019>. Acessado em 10 jan. 2022. 2020.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção dos cafés do Brasil ocupa área de 1,82 milhão de hectares dos quais 1,45 milhão são de café arábica e 375,99 mil de conilon.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/64630822/producao-dos-cafes-do-brasil-ocupa-area-de-182-milhao-de-hectares-dos-quais-145-milhao-sao-de-cafe-arabica-e-37599-mil-de-conilon>. Acessado em: 10 jan. 2022. 2021a.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção mundial de café robusta deve atingir 77,1 milhões de sacas de 60 kg na safra 2021-2022 e quebrar recorde histórico.** Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/65533440/producao-mundial-de-cafe-robusta-deve-atingir-771-milhoes-de-sacas-de-60kg-na-safra-2021-2022-e-quebrar-recorde-historico>. Acessado em: 10 jan. 2022. 2021b.

FAITA, M.R., CHAVES, A., NODARI, R.O. The expansion of agribusiness: harmful impacts of deforestation, pesticides and transgenics on bees. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v.57, p.79-105, 2021.

FARDER-GOMES, C. F.; FERNANDES, K. M., BERNARDES, R. C.; et al. Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini). **Science of Total Environment**, v.792, 148978, 2021.

FERRAZ E SILVA, M., NASCIMENTO, L. O. L. S., PÉREZ-MALUF, R. Abelhas polinizadoras e produção de frutos e sementes em café convencional. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v.3, n.4, p.4227-4237, 2020.

FREITAS, B. M., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., MEDINA, L. M., KLEINERT, A. M. P., GALETTO, L., NATES-PARRA, G., QUEZADA-EUÁN, J. J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v.40, p.332-346. 2009.

GARIBALDI, L. A., STEFFAN-DEWENTER, I., WINFREE, R., AIZEN, M.A., BOMMARCO, R., et al. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science**, v.33, 6127, 2013.

GOBATTO, A. L. **Avaliação do sucesso de áreas restauradas no restabelecimento das faunas de abelhas e vespas solitárias que nidificam em cavidades preexistentes, e seus inimigos naturais em paisagens altamente manejadas**. Tese de Doutorado. 161f. Londrina, PR, 2021.

GOULSON, D. Effects of introduced bees on native ecosystems. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.34, p.1–26, 2003.

GOULSON, D., NICHOLLS, E., BOTÍAS, C., ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**. 347, 6229, 1255957-1 – 1255957-9. 2015.

GRÜTER, C. **Stingless bees: Their behaviour, ecology and evolution**. Springer, 385p. 2020.

GUBERT-FILHO, F. A. O desflorestamento do Paraná em um século. *In*: Sonda, C., Trauczynski, S.C. (Org.). **Reforma agrária e meio ambiente – teoria e prática no Estado do Paraná**. Curitiba: ITCG, 15-25. 2010.

IPBES. 2016. **Summary for policymakers of the methodological assessment of scenarios and models of biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**. Acesso em: 01 mar. 2022. [https://www.researchgate.net/publication/311104558\\_IPBES\\_2016](https://www.researchgate.net/publication/311104558_IPBES_2016) .

IDR – Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná. **Café**. Disponível em: <https://www.idrparana.pr.gov.br/Pagina/Cafe>. Acesso em: 20 fev. 2022.

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

JACOB, C. R. O.; ZANARDI, O. Z.; MALAQUIAS, J. B.; et al. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v.224, p.65-70, 2019.

KEVAN, P.G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity, and diversity. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.373-393, 1999.

KLEIN, A. M. Nearby rainforest promotes coffee pollination by increasing spatio-temporal stability in bee species richness. **Forest Ecology and Management**. 258, ) 1838–1845, 2009.

KLEIN, A. M., STEFFAN-DEWENTER, I., TCHARNTKE, T. Bee pollination and fruit set of *Coffea arabica* and *C. canephora* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v.90, n.1, p.153-7, 2003.

KLEIN, A. M., VAISSEIÈRE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C., TCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of Royal Society B**, v.274, p.303-313, 2007.

KREMEN, C., WILLIAMS, N. M., THORP, R. W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **PNAS**, v.99, n.26, p.16812–16816, 2002.

LEBUHN, G., DROEGE, S., CONNOR, E. F., et al. Detecting insect pollinator declines on regional and global scales. **Conservation Biology**, v.27, n.1, p.113–120, 2012.

LEITE, D. T.; SAMPAIO, R. B.; CHAMBÓ, E. D.; et al. Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, 2021.

MALERBO-SOUZA, D. T., HALAK, A. L. Agentes polinizadores e produção de grãos

em cultura de café arábica cv. "Catuaí Vermelho". **Científica**, v.40, p.1-11, 2012.

MALERBO-SOUZA, D. T., NOGUEIRA-COUTO, R. H., COUTO, L. A., SOUZA, J. C. Atrativo para as abelhas *Apis mellifera* e polinização em café (*Coffea arabica* L.). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.272-278, 2003.

MALLINGER, R. E., GAINES-DAY, H. R., GRATTON, C. Do managed bees have negative effects on wild bees?: A systematic review of the literature. **Plos One**, 0189268, p.1-32, 2017.

MATOS, W. B.; SANTOS, A. C. C.; LIMA, A. P. S.; et al. Potential source of ecofriendly insecticides: Essential oil induces avoidance and cause lower impairment on the activity of a stingless bee than organosynthetic insecticides, in laboratory. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 209, 111764. 2021.

MELO, B., SOUSA, L. B. Biologia da reprodução de *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.6, n.2, p.1-7, 2011.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees**. Cambridge: Belknap Press. 1974.

MILLARD, J., OUTHWAITE, C. L, KINNERSLEY, R., et al. Global effects of land-use intensity on local pollinator biodiversity. **Nature Communications**, v.12, n.1, 2902, 2021.

MORAIS, C. R.; TRAVENÇOLO, B. A. N.; CARVALHO, S. M.; et al. Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). **Chemosphere**, v.206, p.632-342, 2018.

MORELLATO, L. P. C., HADDAD, C. F. B. Introduction: The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v.32, n.4b, p.786-792, 2000.

OLIVEIRA-FILHO, A. T., FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among atlantic forests in southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v.32, p.793-810, 2000.

OLIVEIRA, C. V. P.; GIGLIOLI, A. A. S.; GALHARDO, D.; et al. Effects of biopesticides in *Tetragonisca angustula* Latreille (Hymenoptera: Meliponinae) pollinators. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 23, n. 2, e2301, 2020.

OTESBELGUE, A.; SANTOS, C. F.; BLOCHTEIN, B. Queen bee acceptance under threat: Neurotoxic insecticides provoke deep damage in queen-worker relationships. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.166, p.42-47, 2018.

PARANÁ. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. 2022. **Levantamento da produção agropecuária**. Disponível em: <https://www.agricultura.pr.gov.br/deral/ProducaoAnual> Acessado em: 20 fev. 2022.

PEDRO, S. R. M., CAMARGO, J. M. F. Interactions on floral resources between the Africanized honey bee *Apis mellifera* L and the native bee community (Hymenoptera: Apoidea) in a natural "cerrado" ecosystem in southeast. Brazil. **Apidologie**, v.22, p.397-415, 1991.

PERUZZOLO, M. C., CRUZ, B. C., RONQUI, L. Polinização e produtividade do café no Brasil. **Pubvet**, 13, n.4, p.1-6, 2019.

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

PRIORI, A., POMARI, L. R.; AMÂNCIO, S. M., IPÓLITO, V. K. História do Paraná: séculos XIX e XX [online]. Maringá: Eduem. **A cafeicultura no Paraná**, p.91-104, 2012.

RHODES, C. J. Pollinator decline – an ecological calamity in the making? **Science Progress**, v.10, n.2, p.121–160, 2018.

RICKETTS, T. H. Tropical forest fragments enhance pollinator activity in nearby coffee crops. **Conservation Biology**, v.18, n.5, p.1262–1271, 2004.

RICKETTS, T. H., REGETZ, J., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C., et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, v.11, n.5, p.499-515, 2008.

ROUBIK, D. W. The value of bees to the coffee harvest. **Nature**. 417, 708. 2002

ROUBIK, D. W, MORENO, J. E, VERGARA, C., WITTMANN, D. Sporadic food competition with the African honey bee: projected impact on neotropical social bees. **Journal of Tropical Ecology**, v.2, p.97–111,1986.

ROULSTON, T. H, GOODELL, K. The role of resources and risks in regulating wild bee populations. **Annual Review of Entomology**, v.56, p.296-312, 2011.

SANTOS, C. F.; ACOSTA, A. L.; DORNELES, A. L.; et al. Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. **Scientific Reports**, v.6, 31605, 2016.

SOUZA, F. F., SANTOS, J. C. F., COSTA, J. N. M., SANTOS, M. M. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 21 p. 2004.

TEIXEIRA, V. R. Efeito da polinização por abelhas na frutificação do café. **Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Biológicas**. Uberlândia, MG. 2019.

TOREZAN, J. M. D. Nota sobre a vegetação da bacia do rio Tibagi, p. 103-107. In: Medri, M.E.; Bianchini, E.; Shibatta, O.A., Pimenta, J.A. (org.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: ME Medri. 2002.

VALDOVINOS-NÚÑEZ, G. R., QUEZADA-EUÁN, J. J. G., ANCONA-XIU, P., MOO-VALLE, H., CARMONA, A., SÁNCHEZ, E. R. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Entomological Society of America**, v.102, n.5, p.1737-1742, 2009.

VERGARA, C. H., BADANO, E. I. Pollinator diversity increases fruit production in Mexican coffee plantations: The importance of rustic management systems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.129, p.117–123, 2009.

WILMS, W., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., ENGELS, W. Resource partitioning between highly eusocial bees and possible impact of the introduced Africanized

honey bee on native stingless bees in the Brazilian Atlantic Rainforest. **Studies on the Neotropical Fauna Environmental**, v.31, p.137-151, 1996.

ZATTARA, E. E.; AIZEN, M. A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. **One Earth**, v.4, n.1, p.114, 2021.

## CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho reúne as metodologias que têm sido desenvolvidas para a análise dos possíveis efeitos subletais em abelhas-sem-ferrão e mostra, através de uma revisão de literatura, que mesmo em baixas doses, agrotóxicos pertencentes a diversos grupos químicos, são prejudiciais para a sobrevivência das abelhas nativas. Isso porque, mesmo não causando a mortalidade imediata, o contato destes insetos polinizadores com os agrotóxicos, pode levar à efeitos danosos em seu comportamento, fisiologia e genética.

Por meio de uma meta-análise foi possível comprovar que abelhas-sem-ferrão expostas (de forma oral, tópica ou por contato) a diferentes tipos de inseticidas liberados para uso no Paraná, são significativamente prejudicadas por esses produtos, mesmo em baixas doses. Ainda, estudos com larvas de abelhas-sem-ferrão necessitam ser desenvolvidos, para a melhor avaliação do real efeito dos inseticidas neste estágio de vida e provável impacto destes produtos no desenvolvimento das abelhas.

Em um levantamento da riqueza e abundância de abelhas visitantes de flores do cafeeiro, foi possível constatar a alta abundância de abelhas *Apis mellifera* em relação a espécies de abelhas nativas. Sugere-se que tal espécie possa afetar negativamente a exploração dos recursos florais pelas abelhas nativas nos cultivos de café analisados, isso porque, a introdução de espécies pode causar prejuízos a espécies nativas. Além disso, estudos que avaliem o efeito da paisagem sobre a fauna de abelhas visitantes de cultivos agrícolas são necessários, já que o desmatamento e fragmentação de habitats também estão entre as principais causas do declínio de polinizadores.