

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - *campus* SOROCABA

CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



BARBARA SILVA BARBOSA

INFLUÊNCIA DAS ETIQUETAS ELETRÔNICAS DE TECNOLOGIA RFID NA ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona quadrifasciata* (LEPELETIER, 1836) CONTAMINADAS COM IMIDACLOPRIDO

SOROCABA – SP

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BARBARA SILVA BARBOSA

**INFLUÊNCIA DAS ETIQUETAS ELETRÔNICAS DE TECNOLOGIA RFID NA
ANÁLISE COMPORTAMENTAL DE ABELHAS SEM FERRÃO *Melipona quadris-*
ciata (LEPELETIER, 1836) CONTAMINADAS COM IMIDACLOPRIDO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Departamento de Biologia da Universidade
Federal de São Carlos *Campus* Sorocaba - UFS-
Car como parte dos Requisitos para obtenção
do Título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof. Dr. Rogério Hartung Toppa.

Co-orientação: Dr^a. Pâmela Decio.

SOROCABA – SP

2022

Barbosa, Barbara Silva

Influência das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID
na análise comportamental de abelhas sem ferrão
Melipona quadrifasciata (LEPELETIER, 1836)
contaminadas com imidacloprido / Barbara Silva Barbosa
-- 2022.
44f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Rogério Hartung Toppa

Banca Examinadora: Elaine Mathias da Silva Zacarin,
Mariana Victorino Nicolosi Arena

Bibliografia

1. Abelha. 2. Agrotóxico. 3. RFID. I. Barbosa, Barbara
Silva. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8
6979

Folha de aprovação

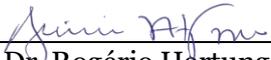
Barbara Silva Barbosa

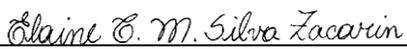
“Influência das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID na análise comportamental da abelhasem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Lepelletier, 1836) contaminadas com imidaclopidro”

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – *campus* Sorocaba

Sorocaba, 06 de setembro de 2022.

Orientador 
Prof. Dr. Rogério Hartung Toppa

Membro 1 
Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Membro 2 
Ma. Mariana Victorino Nicolasi Arena

Dedico este trabalho às mães solo do Brasil. Mães que assumem de forma exclusiva todas as responsabilidades pela criação dos filhos, tanto financeiras quanto afetivas, em uma família monoparental.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Lúcia Da Silva, pelo apoio emocional e financeiro.

À minha irmã Beatriz Silva Barbosa, pelos conselhos e apoio durante toda a trajetória da graduação.

Ao meu companheiro e melhor amigo Nicolas De Castro Silva, sou grata pelas várias vezes em que foi o meu suporte. Certamente, a conclusão desta etapa em minha vida não teria sido possível sem o auxílio dele.

Ao programa de Iniciação Científica e Tecnológica sem remuneração (ICT-SR) da UFSCar ao qual o projeto é vinculado.

À UFSCar Sorocaba, pelo espaço físico cedido para realização da pesquisa, principalmente ao Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental (LEMA) e ao Núcleo de Pesquisa sobre Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (NuPECA).

Ao professor Prof. Dr. Rogério Hartung Toppa, pela orientação acadêmica. À Pâmela Decio, por me ensinar sobre as análises laboratoriais e ensaios ecotoxicológicos, seus ensinamentos foram de suma importância para a minha primeira vivência em laboratório de pesquisa, além de todo o suporte emocional e acadêmico.

À Rafaela por toda ajuda quanto a análise comportamental e estatística, além das orientações prestadas durante todo o projeto.

À minha dupla científica Rebeca Castor, pelo auxílio em atividades durante a execução do projeto. Ao Edson Sampaio, associado à Cooperativa de Apicultores de Sorocaba (COAPIS), por disponibilizar colônias e sanar dúvidas acerca do manejo e comportamento das abelhas.

À turma de graduação do bacharelado 2017, em especial meus amigos: Isis Minhós Yano, João Victor Cassiel Ferraz, Isabelle Christine Corrêa de Araújo, João Victor Mendonça de Oliveira, João Victor de Oliveira Sousa e Fernanda Campos dos Santos, por todos os conselhos, motivações e momentos inesquecíveis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema representativo do delineamento experimental. Os círculos correspondem aos indivíduos representantes dos grupos experimentais: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente.....18
- Figura 2 – (A) Coleta dos indivíduos. (B) Recipiente utilizado para a coleta de indivíduos da espécie *M. quadrifasciata*.....19
- Figura 3 – Abelha da espécie *Melipona quadrifasciata* imobilizada em um marcador de abelha rainha após colagem da etiqueta eletrônica de tecnologia RFID.....20
- Figura 4 – Esquema representativo da arena de locomoção, visão lateral, frontal e isométrica.....21
- Figura 5 – Consumo médio de solução de sacarose 50% m/v durante o período de exposição ao agrotóxico Imidacloprido. Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID) controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente. “a”, “b” e “ab” indicam a proximidade estatística entre os grupos experimentais em relação ao consumo.....25
- Figura 6 – Avaliação dos parâmetros de mobilidade em *Melipona quadrifasciata* expostas ao Imidacloprido e com a fixação das etiquetas de tecnologia RFID. Mobilidade Total: (A) Dispersão dos dados e (B) Gráfico de tamanho de efeito baseado na média e intervalo de confiança dos dados em comparação com o grupo Controle. **Altamente Móvel:** (C) Dispersão dos dados e (D) Gráfico de tamanho de efeito baseado na média e intervalo de confiança dos dados em comparação com o grupo Controle. **Móvel:** (E) Dispersão dos dados e (F) Gráfico de tamanho de efeito baseado na média e intervalo de confiança dos dados em comparação com o grupo Controle. **Imóvel:** (G) Dispersão dos dados e (H) Gráfico de tamanho de efeito baseado na média e intervalo de confiança dos dados em comparação com o grupo Controle. (CTL). Nos gráficos de dispersão a porcentagem (%) é dada pela locomoção da abelha dentro da área completa da arena em cm/s, enquanto nos gráficos de tamanho de efeito, a média e o intervalo de confiança são demonstrados em relação a todos os grupos experimentais. Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA),

Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente.....27

Figura 7 – Resposta à Luminosidade. Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e acetona com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente. Nos gráficos de dispersão a porcentagem (%) é dada pela locomoção da abelha dentro da área completa da arena em cm/s, enquanto nos gráficos de tamanho de efeito, a média e o intervalo de confiança são demonstrados em relação a todos os grupos experimentais.....28

Figura 8 – Avaliação de Visitação ao alimentador. Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente. Nos gráficos de dispersão a porcentagem (%) é dada pela locomoção da abelha dentro da área completa da arena em cm/s, enquanto nos gráficos de tamanho de efeito, a média e o intervalo de confiança são demonstrados em relação a todos os grupos experimentais.....28

Figura 9 – Avaliação do deslocamento. Diferença média da distância percorrida em centímetros pelas abelhas por toda arena, utilizando como referência o grupo controle (CTL). Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente. Nos gráficos de dispersão a porcentagem (%) é dada pela locomoção da abelha dentro da área completa da arena em cm/s, enquanto nos gráficos de tamanho de efeito, a média e o intervalo de confiança são demonstrados em relação a todos os grupos experimentais.....29

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Variáveis comportamentais analisadas23

Tabela 1 – Mortalidade total das abelhas durante o período de 48 horas.....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTL - Controle

CA - Controle Acetona

I - Imidacloprido

CTL_RFID - Controle e etiqueta de tecnologia RFID

CA_RFID - Controle Acetona e etiqueta de tecnologia RFID

I_RFID - Imidacloprido e etiqueta de tecnologia RFID

RFID - *Radio-Frequency Identification*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Delineamento experimental.....	17
3.2	Coleta do material biológico e manutenção em condições laboratoriais.....	18
3.3	Fixação das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID	19
3.4	Preparação do alimento contaminado e exposição contínua	20
3.5	Arena de locomoção	20
3.6	Filmagem.....	22
3.7	Coleta de dados e análise comportamental.....	22
3.8	Análises de dados	23
4	RESULTADOS	25
4.1	Consumo.....	25
4.2	Sobrevivência	25
4.3	Dados Comportamentais.....	26
4.3.1	Mobilidade.....	26
4.3.2	Estímulo à Luminosidade	27
4.3.3	Visitação ao Alimentador	28
4.3.4	Deslocamento	29
5	DISCUSSÃO	30
6	CONCLUSÕES.....	36
7	REFERÊNCIAS	37

RESUMO

BARBOSA, Barbara Silva. Título: Influência das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID na análise comportamental de abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (LEPELETIER, 1836) contaminadas com imidacloprido. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2022.

Com a finalidade de elucidar questões acerca da potencialidade do monitoramento tecnológico de abelhas nativas, foi analisada a influência das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID em relação ao comportamento de abelhas sem ferrão da espécie *Melipona quadrifasciata* exposta ao neonicotinóide imidacloprido, em uma abordagem laboratorial. A concentração do imidacloprido utilizada nos bioensaios após a fixação das etiquetas foi selecionada conforme concentrações identificadas no néctar de plantas polinizadas pela espécie (10 ppb; Sigma-Aldrich, CAS Number: 138261-41-3, pureza > 99%). Foram realizadas filmagens dos indivíduos em arenas de locomoção com posicionamento vertical, para a avaliação da atividade de voo e a mobilidade, juntamente com a finalidade de analisar o comportamento diante da presença de um estímulo luminoso superior e um alimento atrativo. Com o auxílio do software EthoVision XT, foi observada a integração de dados e automação de experimentos comportamentais com abelhas, e os resultados obtidos durante o experimento mostraram que as etiquetas eletrônicas não interferiram nos padrões de consumo do alimento e sobrevivência das abelhas durante o período de 48h de exposição. No entanto, os dados acerca da análise comportamental mostraram que as etiquetas eletrônicas apresentam influência na mobilidade em grupos associados ao agrotóxico imidacloprido, podendo indicar uma relação entre o estresse causado pelo peso das etiquetas e os possíveis efeitos da dose subletal do neonicotinóide. Devido à natureza sensível desta tecnologia, ainda não é possível fornecer detalhes específicos sobre como as etiquetas podem ser aperfeiçoadas, porém espera-se que os dados coletados por meio deste estudo colaborem para a otimização e entendimento da tecnologia de RFID para pesquisas comportamentais futuras.

Palavras-chaves: RFID, Imidacloprido, Abelhas Neotropicais, Abelhas Sem Ferrão.

ABSTRACT

In order to elucidate questions about the potential of technological monitoring of native bees, the influence of electronic RFID technology tags was analyzed in relation to the behavior of stingless bees of the species *Melipona quadrifasciata* exposed to neonicotinoid imidacloprid, in a laboratory approach. The concentration of imidacloprid used in the bioassays after fixing the tags was selected according to the concentrations identified in the nectar of plants pollinated by the species (10 ppb; Sigma-Aldrich, CAS Number: 138261-41-3, purity > 99%). Recording of the individuals was carried out in locomotion arenas with vertical positioning, for the evaluation of the flight activity and the mobility of the bees, together with the purpose of analyzing the behavior in the presence of a superior light stimulus and an attractive food. With the help of EthoVision XT software, data integration and automation of behavioral experiments with bees were observed, and the results obtained during the experiment showed that electronic tags did not interfere with food consumption patterns and bees survival during the period of 48 hours of exposure. However, data from behavioral analysis showed that electronic tags have an influence on mobility in groups associated with the pesticide imidacloprid, which may indicate a relationship between the stress caused by the weight of the tags and the possible effects of the sublethal dose of neonicotinoid. Due to the sensitive nature of this technology, it is not yet possible to provide specific details on how the tags can be improved, but it is hoped that the data collected through this study will contribute to the optimization and understanding of RFID technology for future behavioral research.

Keywords: RFID, Imidacloprid, Neotropical Bees, Stingless Bees

1 INTRODUÇÃO

As abelhas são altamente vulneráveis à contaminação por forragear em áreas potencialmente contaminadas, e existe uma escassez de dados relacionados à toxicidade sobre espécies de abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) no Brasil (CHAM et al., 2020). Uma das espécies nativas ainda pouco estudadas é a *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier, 1837), também conhecida popularmente como “mandaçaia”, que é encontrada no Sul de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (MOURE, 1975). A mandaçaia é importante para a agricultura, pois poliniza culturas agrícolas de espécies vegetais como: abóbora (*Cucurbita moschata*), pimentão (*Capsicum annuum*), pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens*) e o tomate (*Lycopersicon esculentum*) (OLIVEIRA et al., 2013).

Estudos como o de Lima et al, (2020) et al., (2015) apresentam os efeitos do agrotóxico imidacloprido no comportamento da espécie *M. quadrifasciata*, constatando que interfere na comunicação entre os indivíduos em decorrência da redução dos eventos de antenação, da frequência respiratória e a atividades ligadas às atividades de campo como o forrageamento e o próprio voo.

A aplicabilidade com maior potencial no monitoramento tecnológico das abelhas utilizando as etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID, dentro do contexto histórico das últimas décadas é a de buscar entender como a flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos pode influenciar de forma negativa quanto à proteção do meio ambiente e a saúde humana, visto que o governo brasileiro adota a monocultura e o uso intensivo de agrotóxicos como política agrícola de modernização no campo desde os anos 1970, incentivando a indústria química formuladoras de agrotóxicos por meio de isenções fiscais (ALMEIDA et al., 2017).

Com o auxílio do software de vídeo tracking EthoVision XT (Noldus Information Technologies) (Noldus, 2001) podemos avaliar a integração de dados e automação de experimentos comportamentais com abelhas, assim como em (Tadei et al., 2019), possibilitando o uso da combinação das etiquetas eletrônicas, com a finalidade de avaliar sua influência na variação comportamental destes polinizadores e promovendo informações que contribuam para o aprimoramento de protocolos utilizados para estimar os efeitos dos pesticidas em níveis subletais.

Detectar os movimentos rápidos e arbitrários de insetos em condições de campo é notoriamente difícil porque as tecnologias existentes são limitadas por questões de tamanho, peso, alcance e custo (BARLOW et al., 2019). Porém, o sistema de identificação por radiofrequência (RFID) demonstra-se como uma opção viável para os estudos comportamentais de campo, as-

sim como os apresentados por (Nunes et al., 2019; TOPPA et al., 2021). Tais estudos são importantes porque permitem detectar e monitorar os caminhos e movimentos das abelhas e se a presença de agrotóxicos como o imidacloprido podem prejudicar o seu comportamento (BARLOW et al., 2019).

A empregabilidade de etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID (*Radio Frequency Identification*) como microssensores hoje é bem conhecida quanto suas vantagens e desvantagens (NUNES-SILVA et al., 2019; DE SOUZA, 2018). Entretanto, existe também a necessidade de pesquisas que monitorem e coletem informações acerca destes sensores já que, embora apresentem tamanho reduzido, a colocação das etiquetas eletrônicas pode acarretar mudanças de comportamento dos indivíduos submetidos ao procedimento de fixação do dispositivo, podendo influenciar em seu desempenho quanto a mobilidade, interações ecológicas e em sua autonomia de voo (MINAHAN et al., 2018).

É de suma importância sanar questionamentos acerca do uso das etiquetas e sua possível influência no comportamento das abelhas, a fim de usarmos estes animais como bioindicadores de forma eficaz, como descrito no estudo de Nunes-Silva et al., (2019), que apresenta a tecnologia RFID e suas aplicações para o monitoramento e reconhecimento individual de abelhas e a importância sobre necessidade de informações adicionais que auxiliem na determinação do impacto e das ameaças ambientais que possam vir a ocorrer nestas populações, especialmente entre as espécies nativas.

Estudar o movimento, migração e comportamento de insetos pode ajudar a fornecer respostas para importantes questões ecológicas que impactam a diversidade, saúde e persistência de espécies em ecossistemas e, diante do exposto, os objetivos desta pesquisa estão associados a seguinte questão: As etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID podem influenciar no comportamento e na mobilidade de abelhas da espécie *M. quadrifasciata* expostas ao neonicotinóide imidacloprido?

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo analisar os padrões comportamentais de abelhas da espécie *Melipona quadrifasciata* expostas ao neonicotinóide imidacloprido, e se as etiquetas eletrônicas têm papel em possíveis alterações destes padrões.

Especificamente, a pesquisa procurou analisar a influência das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID nas atividades locomotoras das abelhas *M. quadrifasciata*, em condições laboratoriais, após a exposição a uma dose subletal do agrotóxico imidacloprido, assim como avaliar se as etiquetas eletrônicas afetam a sobrevivência da *M. quadrifasciata* expostas ao imidacloprido.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As abelhas sem ferrão pertencem à família Apidae, subfamília Meliponinae. (TAVARES, 2017; SCHWARZ, 1032). Os meliponíneos constituem o maior grupo de abelhas eussociais do mundo, possuindo mais de 600 espécies descritas, sendo encontradas na América do Sul, América Central, sul da América do Norte, África, sudeste da Ásia e no norte da Oceania (HRNCIR et al., 2016). No Brasil, há mais de 200 espécies pertencentes a 29 gêneros, e cerca de 89% das espécies são endêmicas, o que corresponde a aproximadamente 20% do número total de abelhas neotropicais sem ferrão existentes (PEDRO; SILVIA, 2014).

A diferença mais marcante no grupo dos meliponíneos é a ausência do ferrão ou a ocorrência de uma forma atrofiada (OLIVEIRA et al., 2013). Assim, como forma de defesa, apresentam um aparelho bucal dotado de mandíbulas, que são capazes de produzir ácido fórmico, aumentando o incômodo quando mordem (CRUZ-LANDIM, 2009). Estas abelhas divergem desde o Cretáceo, tendo 50% mais espécies que o gênero *Apis*, apresentando uma enorme diversidade (ROUBIK; DAVID, 2006).

A preocupação com o declínio das populações de abelhas em todo o mundo tornou-se uma questão ambiental de grande importância, e entender a dimensão e as consequências desse problema é fundamental para avançar efetivamente em direção aos objetivos de conservar a biodiversidade e proteger a saúde das abelhas (COLLA, 2022). Embora o desaparecimento das abelhas possa acontecer em decorrência de diversas razões, a aplicação de pesticidas é reconhecida como um dos principais fatores de estresse quanto à causalidade do declínio na população global de abelhas (DE ASSIS et al., 2022).

As espécies nativas de polinizadores têm recebido pouca atenção quanto aos riscos impostos por inseticidas, principalmente quanto aos neonicotinóides, que são considerados um dos fatores condutores de declínios generalizados na diversidade e abundância das abelhas (TOMÉ et al., 2015). Concentrações subletais de neonicotinóides alteram o comportamento de abelhas sociais e reduzem a sobrevivência de colônias inteiras (DE ASSIS et al., 2022). Registrados na década de 1990, em 2010 representavam um terço do mercado global de inseticidas, mas após uma moratória em 2013, seu uso em culturas de campo aberto foi completamente proibido na União Europeia em 2018 (SGOLASTRA et al., 2020). O Imidacloprido, um inseticida sistêmico pertencente a classe dos neonicotinóides, é derivado do nitrometileno, sintetizado pela Nihon Bayer Agrochem KK (JEANMART, 2016). Além de ser extremamente eficaz

contra insetos, também apresenta efeitos ovicidas, atuando como estimulador do receptor nicotínico da acetilcolina, sendo excelente no controle de todas as populações de pragas resistentes investigadas até o momento (ELBERT et al., 1991.)

Após aplicação foliar, o imidacloprido apresenta elevada ação residual, é altamente fotostável e apresenta resistência satisfatória à ação da chuva (ELBERT et al., 1991). Segundo o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) pode ser encontrado de maneira residual em amostras de culturas agrícolas de goiaba em concentrações 5,30% (mg/kg), acima do LMR - Limite Máximo de Resíduos adotado, que seria de 0,1% (ANVISA, 2008). Segundo a avaliação de risco ambiental do ingrediente imidacloprido para insetos polinizadores, e com base no parecer técnico (IBAMA, 2013), recomenda-se o prosseguimento da investigação da hipótese de risco ambiental para as abelhas melíferas, porém, não há dados disponíveis que permitam avaliar os níveis decorrentes da utilização de imidacloprido em aplicações de um mesmo cultivo, situação que pode ocorrer considerando os usos atualmente autorizados.

Estudos que buscam demonstrar as ameaças e declínio global dos polinizadores como os de Dicks et al., (2021) e Potts et al., (2016), evidenciam a importância da compreensão da escala e gravidade dos impactos do declínio de polinizadores no bem-estar humano, e a perda destes organismos impacta negativamente a produção de alimentos voltados ao consumo, pois muitos tipos de culturas dependem da polinização animal para a quantidade e/ou qualidade de seu rendimento.

Quando abordamos os cenários voltados ao declínio de populações de abelhas, grande parte dos estudos encontrados são voltados principalmente à espécie manejada *Apis mellifera*, devido ao alto valor econômico dos seus produtos apícolas e seu reconhecido papel no aumento da produtividade de cultivares (PAUDEL et al., 2015).

No entanto, há a necessidade de intensificar os estudos sobre os fatores do declínio das abelhas nativas melíponas, como o risco dos agrotóxicos (CHAM et al., 2019), perda de habitat e mudanças climáticas (JAFFÉ et al., 2019), uma vez que elas apresentam um importante papel econômico por meio da meliponicultura e da polinização da flora nativa e de plantas cultiváveis (SILVA et al., 2012).

O uso da tecnologia de identificação por radiofrequência (RFID) e a demonstração de sua eficiência ao longo dos anos quanto à sua aplicação para identificação e identificação de objetos, revelam-se como uma ferramenta útil em estudos que analisam o comportamento de insetos, devido a sua capacidade de coleta de dados em relação a alta frequência de eventos que podem ocorrer simultaneamente durante experimentos comportamentais (NGO et al., 2019).

As etiquetas eletrônicas funcionam de maneira semelhante à um microsensor, podendo ser utilizadas em abelhas e vespas para registrar quando os insetos passam por um ponto de verificação específico (CSIRO, 2019). Esta tecnologia vem ganhando cada vez mais popularidade com múltiplas aplicações, e atuando principalmente no setor agroalimentar (BIBI et al., 2017).

A possibilidade de utilização das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID em animais foi inicialmente empregada com a finalidade de fazer integração com sistemas nacionais de identificação de gado ou animais domésticos (FLOYD et al., 2015). A primeira aplicação do uso de sensores eletrônicos em abelhas foi um analisador de frequência dos sons emitidos chamado “Apidctor”, desenvolvido, patenteado e vendido durante a década de 1960. (BROMENSHENK, et al., 2015). Desde então, a ideia inicial vem passando por mudanças em relação aos seus atributos, e as etiquetas eletrônicas utilizadas em estudos de monitoramento de abelhas aumentam o alcance de identificação, mas adicionam peso e podem interferir no comportamento de voo de abelhas da espécie *Apis mellifera*. Com isso, foi necessário se concentrar no desenvolvimento de etiquetas de RFID, que se demonstram mais eficientes para os estudos que envolvam pequenos animais como insetos (BROMENSHENK, et al., 2015).

Vários estudos utilizam e investigam a taxa de sucesso do sistema RFID no monitoramento de insetos. Quando buscamos na literatura pesquisas relacionadas à tecnologia e agentes polinizadores como as abelhas, encontramos em sua maioria estudos de campo e semi campo que analisam o comportamento de forrageamento, como o De Souza et al., (2018), que demonstra como as etiquetas eletrônicas de RFID podem ser eficientes, por conta de seu tamanho, além da capacidade de codificação exclusiva em cada etiqueta, podendo suportar a identificação de milhares de indivíduos em um único experimento. No trabalho de Susanto et al., (2018), os resultados mostram que o RFID permite melhorar a qualidade dos dados que inferem o comportamento das abelhas melíferas em nível de colônia. Em Van Geystelen et al., (2016) é explorado um software integrando aos dados de RFID independentemente do sistema de scanner usado para diferentes tipos de configurações experimentais, padrão que é comum na pesquisa de comportamento de forrageamento.

No artigo de revisão de Nunes-Silva et al., (2019) é mencionado que o tamanho da etiqueta pode representar uma restrição considerável em relação ao tamanho das abelhas, porém, a potencialidade do uso desta tecnologia deve ser investigada incluindo as espécies de abelhas sem ferrão e abelhas solitárias, exemplificando o trabalho de Benaets et al., (2017) que aborda o parasitismo reprodutivo em *Melipona scutellaris*, ilustrando que as etiquetas de RFID podem de fato ser usadas com sucesso na pesquisa de abelhas sem ferrão.

Este método de monitoramento utilizando o RFID não é apenas eficaz para monitorar e detectar as mudanças na atividade de forrageamento por um longo período, mas também para registrar mudanças de curto prazo após exposição aguda (SCHNEIDER et al., 2012). Em Decourtye et al., (2011) as etiquetas eletrônicas foram utilizadas com objetivo de mostrar como o dispositivo pode ser usado para estudar os efeitos dos pesticidas tanto nas características comportamentais quanto na sobrevivência das abelhas. As etiquetas eletrônicas podem ser eficientes quanto à coleta de dados referentes ao comportamento de abelhas, e estudos com marcação eletrônica podem ser projetados para comparar abelhas que carregam as mesmas etiquetas expostas a estressores com aquelas não expostas a esses estressores específicos, supondo-se que o comportamento das abelhas sem etiquetas expostas e não expostas a esses estressores pode ser traduzido sem análise adicional (DE SOUZA et al., 2018).

Porém, estudos que ligam fatores de influência nas metodologias empregadas com o uso de tal tecnologia evidenciam a necessidade de coletar informações acerca das variáveis que possam vir a intervir na clareza dos dados, como em Toppa et al., (2020), que visaram explorar o impacto das colas utilizadas para a fixação das etiquetas em abelhas, analisando a longevidade dos indivíduos após o procedimento, além dos danos causados aos músculos de voo desses insetos, salientando a importância de entendermos melhor o potencial e as limitações do uso de RFIDs em abelhas, principalmente em espécies nativas, e demonstrando que mais estudos são necessários para avaliarmos se essa tecnologia é viável para a avaliação do comportamento de abelhas expostas a agrotóxicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Os ensaios de exposição foram realizados em blocos compostos por seis grupos experimentais, com um número amostral de 15 abelhas por grupo, sendo cinco indivíduos por colônia.

Em cada repetição dos experimentos, foram utilizadas três colônias diferentes (definidas como A, B e C) para a coleta das abelhas, a fim de garantir a variabilidade inter-colonial. Seguindo as recomendações de Alkassab e Kirchner (2018), Jacob et al., (2019) e Tadei et al., (2019). Os grupos experimentais utilizados foram:

- Controle (CTL): abelhas sem etiqueta eletrônica e alimentadas com solução açucarada 50% m/v, contendo água filtrada e açúcar orgânico;
- Controle solvente (CA): abelhas sem etiqueta alimentadas com solução de sacarose e solvente acetona na concentração 0,5 %;
- Imidacloprido (I): abelhas sem etiqueta alimentadas com a solução de sacarose contendo 10 ppb de imidacloprido;
- Controle com fixação da etiqueta eletrônica RFID (CTL_RFID) alimentadas com solução de sacarose;
- Controle solvente com fixação da etiqueta eletrônica (CA_RFID);
- Imidacloprido na concentração 10 ppb com fixação da etiqueta eletrônica RFID (I_RFID).

Os protocolos da OECD (1998; 2017) para ensaios ecotoxicológicos com abelhas, orientam a fazer um controle adicional com solvente, para garantir que os efeitos observados sejam provenientes somente do ingrediente ativo utilizado.

Cada bloco experimental foi composto pelos seis grupos experimentais, contendo cinco abelhas por colônia, totalizando 15 abelhas por grupo e 30 por colônia (Figura 1). O bloco foi repetido três vezes para atingir o número mínimo amostral de 10 indivíduos por grupo, seguindo recomendações dos protocolos (OECD, 2017).

Delineamento experimental						
Grupos	CTL	CA	CA_RFID	CTL_RFID	I	I_RFID
Colônia A	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●
Colônia B	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●
Colônia C	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●	●● ●● ●

Figura 1. Esquema representativo do delineamento experimental dos bioensaios realizados durante o período de 48h. Os círculos correspondem aos indivíduos representantes dos grupos experimentais: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente.

3.2 Coleta do material biológico e manutenção em condições laboratoriais

As colônias manejadas de *Melipona quadrifasciata* foram adquiridas em dois locais distintos: os blocos experimentais I e II foram realizados em um meliponário de propriedade particular da Cooperativa de Apicultores de Sorocaba (COAPIS), no estado de São Paulo, Brasil (-23,49; -47,47), enquanto as coletas dos III e IV foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos – UFSCar campus Sorocaba – São Paulo, Brasil (-23,58; -47,52). A coleta para a realização dos ensaios experimentais ocorreu nos meses correspondentes ao verão (de fevereiro a março de 2022). Os recipientes utilizados potes plásticos de 250 mL (Figura 2) contendo cinco abelhas em atividade de voo por pote, previamente furados nas laterais e na tampa com agulhas aquecidas, para a ventilação, além da inserção de um microtubo de 1,5 mL contendo a solução sacarose 50% m/v, para a alimentação. Os potes contendo as abelhas foram mantidos em incubadora do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) (Eletrolab EL202/E) a 28°C e 70% de

umidade, durante o período de aclimação de 24h. Para a coleta dos dados acerca da sobrevivência, após o período de aclimação na incubadora, a cada 24h após a montagem do experimento, os potes foram verificados para contar o número de indivíduos mortos por tratamento.

Assim, esse monitoramento foi realizado diariamente e o alimento foi pesado a fim de verificar o consumo, descontando-se a taxa diária de evaporação (peso do alimento inicial- peso do alimento após 24h) em (g). Posteriormente o xarope foi renovado, e tal procedimento ocorreu durante o período de exposição, com os dados sendo plotados em uma planilha.



Figura 2. (A) Coleta dos indivíduos. (B) Recipiente utilizado para a coleta de indivíduos da espécie *M. quadrifasciata*.

3.3 Fixação das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID

Foram utilizadas etiquetas de alta frequência (UHF) do modelo IM5- PK2525, versão 3.0, de dimensões 2,5 mm x 2,5mm x 0,3 mm e 5,4 mg, desenvolvida em resina epóxi pela empresa Hitachi Chemicals Co Ltd.: Tokyo Japan (HITACHI, 2016).

De acordo com o protocolo para a fixação de etiquetas eletrônicas descrito por Toppa et al., (2020), foi realizada a escolha do uso de uma cola natural composta de 50% de goma laca orgânica e 50% álcool de cereais, por promover um aumento da longevidade das abelhas e induzir menos danos morfológicos aos músculos de voo em comparação com a cola sintética (TOPPA et al., 2020). A fixação das etiquetas foi realizada diretamente no tórax do animal, com o auxílio de um dispositivo denominado “tubo marcador imobilizador de abelha rainha” (Figura 3) e pinças entomológicas. Cada indivíduo etiquetado foi individualizado em um tubo Falcon 50 mL, por um período de 1 minuto até que a cola estivesse completamente seca, a fim de evitar que as abelhas tentassem remover as etiquetas uma das outras e que ocorressem ataques devido ao odor da substância. Após a secagem da cola, os indivíduos foram alocados individualmente em um recipiente plástico de 250 mL, contendo um alimentador fixado na tampa

(solução aquosa de açúcar orgânico 50%), mantendo-o no escuro no interior da incubadora (temperatura (28°C) e umidade (70 – 75%).

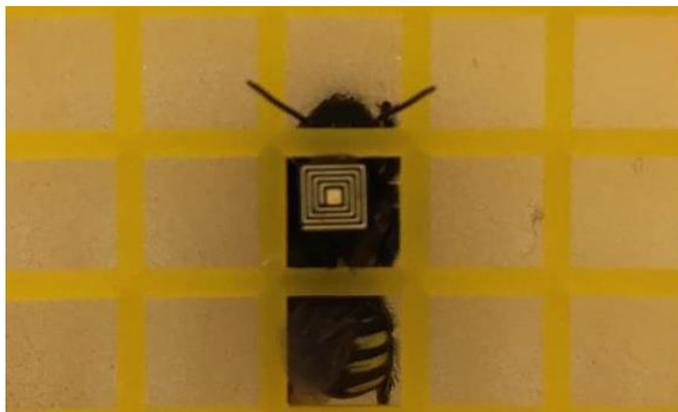


Figura 3. Abelha da espécie *Melipona quadrifasciata* imobilizada em um marcador de abelha rainha após colagem da etiqueta eletrônica de tecnologia RFID.

3.4 Preparação do alimento contaminado e exposição contínua

Buscando um cenário ambientalmente relevante, a concentração do imidacloprido foi selecionada conforme concentrações identificadas no néctar de plantas polinizadas pela espécie de 10 ppb (ALKASSAB; KIRCHNER, 2017; STONER; EITZER, 2012).

Para obtenção do alimento contendo o inseticida nessa concentração, foi preparada inicialmente uma solução estoque (1000 ng/uL) com 10 mg do imidacloprido em pó (Sigma-Aldrich, CAS Number: 138261-41-3, pureza > 99%) diluídos primeiramente em 4 mL de acetona e, posteriormente, adicionados 6 mL de água destilada. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em água destilada, a fim de obter a concentração de 10 ppb. Ao final, uma alíquota de 200 µl de solução aquosa com o inseticida, representando 2% do volume final do alimento, foi adicionada em 9.800 µl de xarope composto por água filtrada e açúcar orgânico (1:1) totalizando 10 mL. Os protocolos da OCDE recomendam não exceder 5% de acetona (OCDE, 2013; 2017), e para o controle solvente, foram utilizados os mesmos critérios, porém com a ausência do agrotóxico imidacloprido nas soluções.

3.5 Arena de locomoção

Para a análise comportamental, primeiramente foi necessário a definição dos parâmetros a serem avaliados, o N experimental, tempo de aclimação e de filmagem. As arenas foram definidas com tamanho suficiente para a locomoção da abelha, posicionadas verticalmente para

a avaliação da atividade de voo e com a presença de uma fonte luminosa superior (Lambin et al., 2001; El Hassani et al., 2005). Duas arenas foram construídas de forma idêntica, com 30x30x10 cm de dimensão, confeccionadas com o material “*Medium Density Fiberboard*” (MDF) 3 mm, além de acetato fosco transparente, contendo uma superfície branca considerando recomendações do *software* Ethovision (Noldus) versão 15 para contraste dos indivíduos.

Também foram inseridos uma tampa lateral circular inferior para fixar o alimentador, um eppendorf de 1,5 mL contendo mel de *Apis mellifera* como atrativo e uma abertura lateral circular superior para colocar as abelhas na superfície. A fonte luminosa artificial foi confeccionada com lâmpadas do tipo led, localizando-se na parte central do topo, para incentivar a atividade de voo ou locomoção vertical da abelha (Figura 4).

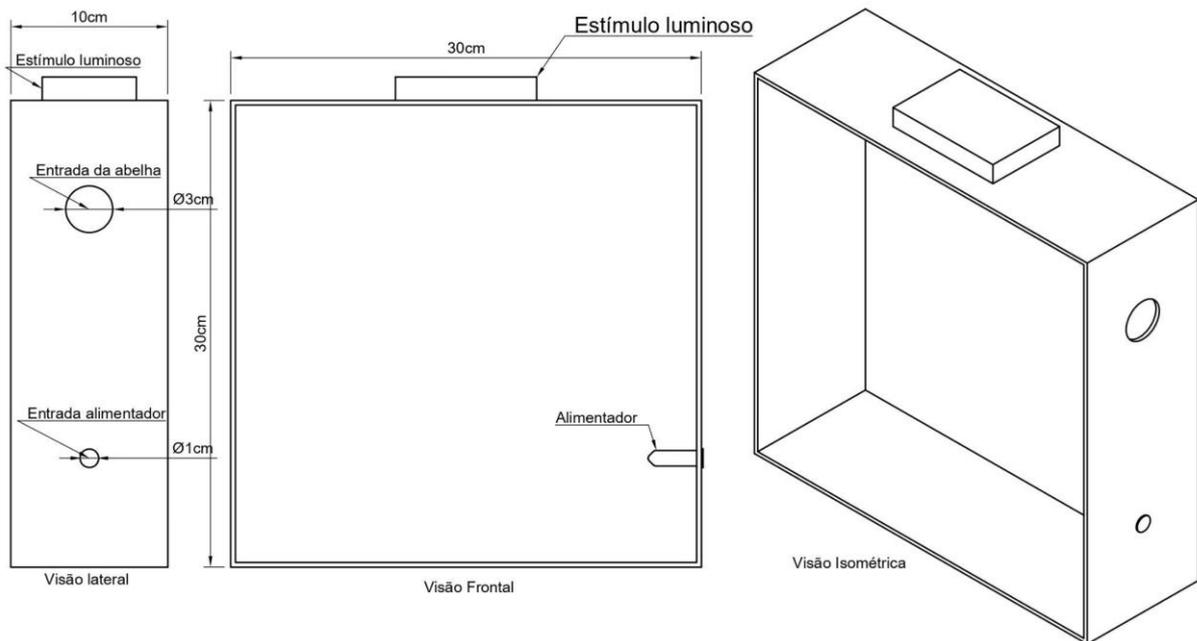


Figura 4. Esquema representativo da arena de locomoção, visão lateral, frontal e isométrica.

3.6 Filmagem

As filmagens foram realizadas entre 13:00 e 17:00 horas, devido ao período de atividade das abelhas. Segundo Tadei et al., (2019) não é recomendado o período de aclimatação para a avaliação da resposta imediata com a possibilidade de análise da orientação guiada por uma fonte luminosa ou fonte alimentar.

Com base nos estudos de El Hassani et al., (2008, 2005), em arenas verticais com uso de iluminação superior, o tempo de filmagem pode variar, pois o objetivo é avaliar a velocidade e o padrão de deslocamento espacial imediato em uma arena dividida em diferentes extratos, como por exemplo, a diferença de luminosidade. Segundo Kimura et al., (2014) as abelhas reagem à luz e as gravações devem ser feitas sob condições especiais, em que os olhos das abelhas percebem como escuridão. Com a finalidade de interromper a interferência da luz artificial do local de experimentação, as luzes permaneceram desligadas, mantendo o ambiente escuro, somente com a influência das luzes presentes nas arenas. O equipamento utilizado para as filmagens foi posicionado a uma distância mínima para aquisição de toda arena e identificação do indivíduo. Parâmetros de temperatura mínima de 25°C e umidade 50%> também foram controlados para evitar interferências comportamentais (BURRILL, DIETZ, 1981; ABOU-SHAARA et al, 2017). Após às 48h da exposição oral *Ad libitum*, a realização das filmagens deu sequência quando cada indivíduo foi isolado em tubos Falcon 50 mL com furos para a ventilação e devidamente identificados, e o período de jejum (15 minutos) cronometrados (CHAKRABARTI et al., 2019; TADEI et al., 2019; JIANG et al., 2018).

Durante o experimento, cada abelha foi transferida para uma arena de locomoção, e seu comportamento foi filmado por 10 minutos ininterruptos, com a intenção de coletar dados acerca da resposta ao estímulo da presença do alimento disposto na arena. Em seguida, a abelha foi removida da arena e colocada em outro recipiente, devidamente identificada, para evitar que uma mesma abelha fosse filmada duas vezes.

3.7 Coleta de dados e análise comportamental

Os vídeos obtidos foram analisados por meio do Software de rastreamento (monitoramento) com base em vídeo Ethovision (Noldus) Versão 15. Os dados comportamentais referentes à locomoção e posição na arena estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Variáveis comportamentais analisadas e parâmetros descritos pelo software Ethovision (Noldus) versão 1.5.

Variável	Descrição
Mobilidade Total (cm/s ⁻¹) %	Velocidade total percorrida dentro da arena, utilizando o ponto central da abelha detectada, mesmo que o indivíduo não se movimente, os pontos utilizados pelo software como referência de detecção utilizam limites de 0,5 e 0,2 cm/s, respectivamente.
Altamente Móvel	Velocidade de locomoção >0,5 cm/s.
Móvel	Velocidade de locomoção >0,2 cm/s.
Imóvel	Velocidade de locomoção <0,2 cm/s.
Frequência à Luz (s)	Número de vezes e tempo de permanência da abelha na zona de estímulo luminoso definida conforme a amplitude da arena (tempo de visitação e revisitação da zona).
Latência \bar{x} (s)	Tempo que a abelha levou para se locomover até o estímulo luminoso da arena (tempo de reconhecimento da zona).
Alimentação	Número de vezes e tempo de permanência da abelha no alimentador.
Velocidade \bar{x} (cm/s ⁻¹)	Velocidade média de locomoção dentro da arena.
Distância Total	Distância total percorrida em (cm) ao longo de 10 minutos de filmagem.

3.7 Análises de dados

As análises estatísticas foram conduzidas no software R (versão 4.0.4; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, AT, 2021). De forma complementar à análise de significância, realizou-se um gráfico de tamanho de efeito por meio de estatísticas de estimação (HO et al., 2019). Os dados comportamentais foram avaliados por meio da construção de modelos lineares generalizados (GLM), com distribuição Poisson para os parâmetros de Mobilidade Total (cm/s-

¹), Quassipoisson para os parâmetros Imóvel, Estímulo à Luminosidade e Visitação ao Alimentador, Gaussian para o estado Móvel e a distribuição Gamma para Velocidade Média e Distância Total (cm s^{-1}). Após a obtenção do GLM foi realizado um pós-teste com um valor P ajustado por Tukey para a comparação par a par entre os grupos experimentais (GOTELLI et al., 2016). Os grupos, colônias e blocos experimentais foram considerados como variáveis independentes. Os pacotes do software R utilizados foram “emmeans”, “multcomp”, “multcompView”, “MASS” e “dabestr”. Quanto à sobrevivência, o pacote “survminer” foi utilizado. A adequabilidade dos modelos aos dados foi avaliada por meio da análise de resíduos Half-plot. Foram considerados modelos válidos aqueles que apresentarem adequabilidade maior que 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Consumo

Em 24 horas de exposição, não houve diferença entre os grupos com e sem etiqueta em relação ao consumo de alimento (GLM - binomial negativo; $P > 0,8$; Figura 5). O grupo experimental imidacloprido apresentou menor taxa de consumo do alimento contaminado em relação ao grupo controle acetona ($P=0,007$), contudo não houve diferença em relação ao grupo controle sem o solvente ($P= 0,83$). Não houve um efeito interativo no consumo das abelhas na presença de RFID e de imidacloprido (GLM - binomial negativo; $F_{(1,66)} = 1,76$; $P = 0,18$) como fatores combinados. Também não houve diferença do consumo médio de solução de sacarose 50% m/v entre os grupos experimentais em 48 horas de exposição, (GLM - Quasipoisson, $P>0,19$).

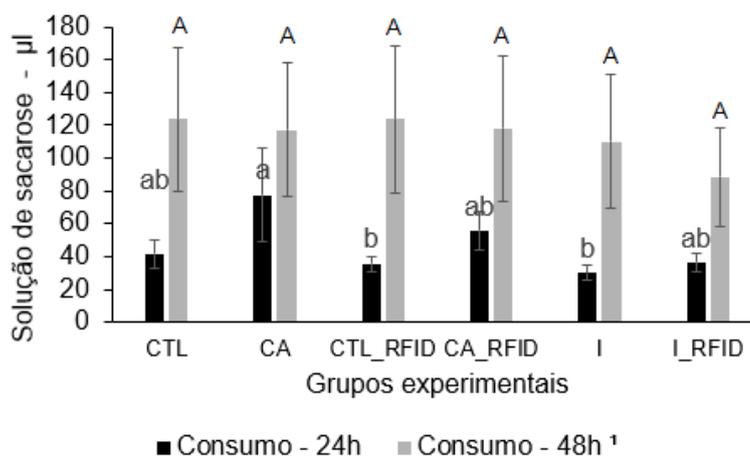


Figura 5. Consumo médio de solução de sacarose 50% m/v durante o período de exposição ao agrotóxico Imidacloprido. Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente. “a”, “b” e “ab” indicam a proximidade estatística entre os grupos experimentais em relação ao consumo.

4.2 Sobrevivência

Durante o tempo de exposição, não houve diferença na taxa de mortalidade das abelhas entre os grupos experimentais (GLM - Binomial; $P>0,41$; Tabela 1).

Tabela 1. Mortalidade total das abelhas durante o período de 48 horas de exposição. Foram considerados como significativos valores ($p \leq 0,05$) em relação aos grupos controle.

Grupo	Mortalidade média %	Intervalo de confiança (95%)
Controle	0,00	0,00
Controle Acetona	6,66	6,25
Controle e RFID	0,00	0,00
Controle Acetona e RFID	1,66	3,66
Imidacloprido	3,33	4,94
Imida e RFID	10	10,1
P %	> 0,41	-

4.3 Dados Comportamentais

4.2.1 Mobilidade

Em relação a Mobilidade Total, somente o grupo experimental I_RFID apresentou redução em relação ao controle CA (GLM - Poisson, $P < 0,001$). Os resultados estão demonstrados na (Figura 6A e 6B).

Em relação à frequência do estado Altamente móvel das abelhas (Figuras 6C e 6D), houve diferença estatística, sendo que todos os grupos experimentais com a etiqueta RFID permaneceram menos tempo neste estado (GLM - Quassipoisson, $P > 0,17$) do que o grupo CTL ($P = 0,002$). Os dois grupos controle com a etiqueta RFID apresentaram médias estatisticamente menores quando comparados com grupo CA. O grupo exposto ao neonicotinóide, I, apresentou uma média de comportamento Altamente Móvel maior que todos os grupos etiquetados.

No estado de mobilidade classificado como Móvel, a média do grupo controle CA foi maior estatisticamente quando comparado com os grupos I e I_RFID (GLM - quassipoisson, $P < 0,04$; Figuras 6E e 6F).

Sobre o estado de mobilidade considerado Imóvel, houve diferença entre os grupos I e I_RFID, que permaneceram neste estado mais tempo, quando comparados com o grupo do controle com solvente CA (GLM - Quassipoisson, $P = 0,04$) Figuras 6G e 6H.

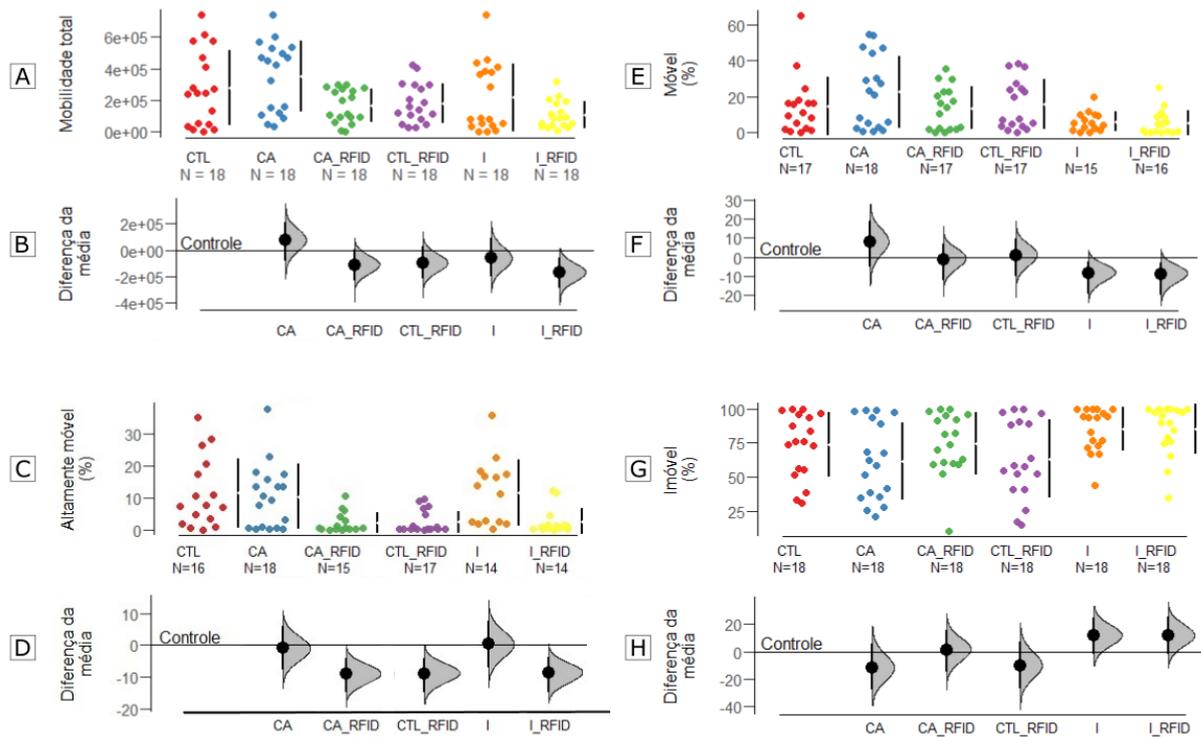


Figura 6. Avaliação dos parâmetros de mobilidade em *Melipona quadrifasciata* expostas ao Imidacloprido e com a fixação das etiquetas de tecnologia RFID. Mobilidade Total: (A) Dispersão dos dados e (B) Gráfico de tamanho de efeito baseado na média e intervalo de confiança dos dados em comparação com o grupo Controle. **Altamente Móvel:** (C) Dispersão dos dados e (D) Gráfico de tamanho de efeito baseado na média e intervalo de confiança dos dados em comparação com o grupo Controle. **Móvel:** (E) Dispersão dos dados e (F) Gráfico de tamanho de efeito baseado na média e intervalo de confiança dos dados em comparação com o grupo Controle. **Imóvel:** (G) Dispersão dos dados e (H) Gráfico de tamanho de efeito baseado na média e intervalo de confiança dos dados em comparação com o grupo Controle (CTL). Nos gráficos de dispersão a porcentagem (%) é dada pela locomoção da abelha dentro da área completa da arena em cm/s, enquanto nos gráficos de tamanho de efeito, a média e o intervalo de confiança são demonstrados em relação a todos os grupos experimentais. Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID), respectivamente.

4.2.2 Estímulo à Luminosidade

Não houve diferença na frequência média de visitação e revisitação na zona de estímulo luminoso pelas abelhas entre nenhum dos grupos experimentais (GLM - Quasipoisson, $P > 0,42$ (Figuras 7I e 7J).

Não foram observadas alterações no parâmetro Latência média entre nenhum dos grupos (GLM - quasipoisson, $P > 0,25$; Figuras 7K e 7L).

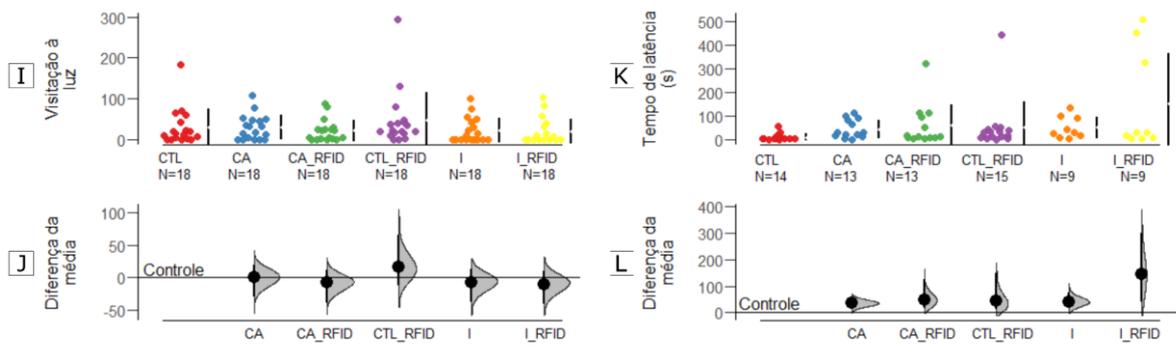


Figura 7. Resposta à Luminosidade. Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente. Nos gráficos de dispersão a porcentagem (%) é dada pela locomoção da abelha dentro da área completa da arena, enquanto nos gráficos de tamanho de efeito, a média e o intervalo de confiança são demonstrados em relação a todos os grupos experimentais.

4.2.3 Visitação ao Alimentador

Não houve diferença na visitação e revisitação das abelhas no alimentador entre os grupos experimentais (GLM - Quasipoisson, $P > 0,10$; Figuras 8M e 8N).

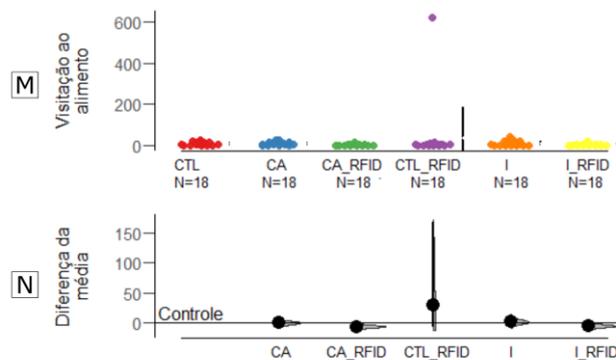


Figura 8. Avaliação de Visitação ao alimentador. Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente. Nos gráficos de dispersão a porcentagem (%) é dada pela locomoção da abelha dentro da área completa da arena em cm/s, enquanto nos gráficos de tamanho de efeito, a média e o intervalo de confiança são demonstrados em relação a todos os grupos experimentais.

4.2.4 Deslocamento

A Velocidade Média das abelhas não diferiu significativamente entre os grupos experimentais (GLM - Gamma, $P > 0,15$; Figuras 9O e 9P). Não houve diferença na Distância Total percorrida das abelhas na arena em todos os grupos experimentais (GLM - Gamma, $P > 0,12$; Figuras 9Q e 9R).

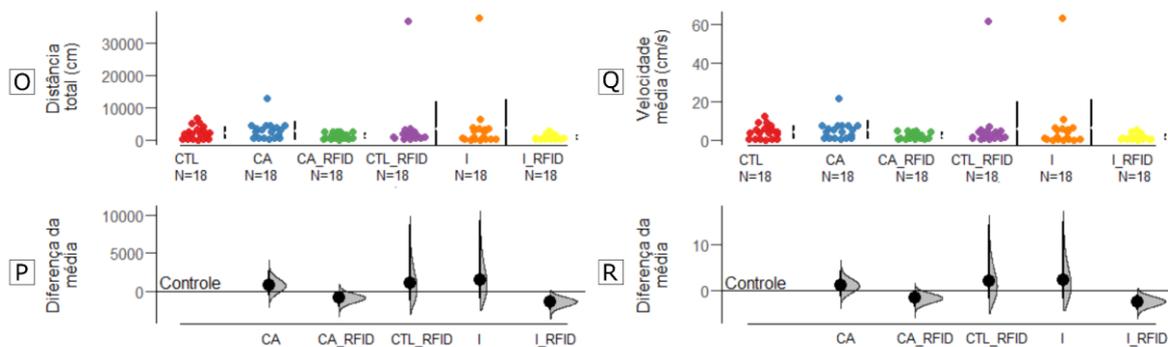


Figura 9. Avaliação do deslocamento. Diferença média da distância percorrida em centímetros pelas abelhas por toda arena, utilizando como referência o grupo controle (CTL). Os grupos experimentais dispostos na imagem são: Grupo controle (CTL), Controle Acetona (CA), Controle com etiqueta eletrônica (CTL_RFID), Controle acetona com etiqueta (CA_RFID), Imidacloprido (I) e Imidacloprido com etiqueta eletrônica (I_RFID) respectivamente. Nos gráficos de dispersão a porcentagem (%) é dada pela locomoção da abelha dentro da área completa da arena em cm/s, enquanto nos gráficos de tamanho de efeito, a média e o intervalo de confiança são demonstrados em relação a todos os grupos experimentais.

5 DISCUSSÃO

A tecnologia RFID tem sido utilizada para estudos de forrageamento com abelhas (NUNES-SILVA, 2019). No entanto, pouco se sabe sobre a influência desses dispositivos no comportamento de abelhas expostas a agrotóxicos. Nosso estudo é o primeiro a avaliar se a fixação de etiquetas RFID afetam a mobilidade de abelhas nativas sem ferrão *M. quadrifasciata* contaminadas oralmente com o neonicotinóide imidacloprido, amplamente utilizado em culturas brasileiras que essas abelhas polinizam.

Recentemente, os estudos de Tomé et al, (2015) e Gomes et al., (2020), abordaram a temática relacionada à avaliação da atividade de voo *in vitro* com abelhas, utilizando-se de metodologias semelhantes, como “torres de decolagem”, para permitir a locomoção livre das abelhas. As análises de voo foram realizadas utilizando abelhas operárias submetidas a dois bioensaios, comparando os efeitos de inseticidas. Porém, ambos estudos não utilizaram etiquetas eletrônicas de RFID em suas metodologias para o monitoramento das atividades.

Com base nos dados de consumo obtidos em nosso estudo, a presença do contaminante imidacloprido na dieta, bem como a presença da etiqueta eletrônica, demonstraram não afetar os hábitos de consumo de *M. quadrifasciata*, assim como não interferiram na sobrevivência das abelhas no período de 48h de observação. Com base na literatura científica, no estudo de Brito et al., (2020) foram utilizadas as concentrações de 10, 35 e 70 ppb de imidacloprido, além de uma concentração de 250 ppb de um produto formulado que possui o neonicotinóide como princípio ativo (Evidence 700 WG®, Bayer). O experimento ocorreu durante sete dias (168h) e não foi observado o aumento da mortalidade nos grupos de abelhas da espécie *M. quadrifasciata*. No entanto, esses autores observaram uma diminuição na proporção de abelhas vivas em todos os grupos durante o experimento, o que foi relacionado ao envelhecimento e mortalidade natural, além de constatarem uma redução no consumo alimentar. Em relação aos dados de consumo, Kessler et al., (2015) indicaram que as abelhas das espécies *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* poderiam optar por consumir uma solução açucarada contaminada com os neonicotinóides imidacloprido, tiametoxam e clotianidina, mesmo que tais substâncias as levassem a comer menos alimento em geral, provavelmente em decorrência dos mecanismos de ação desses agrotóxicos sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no cérebro das abelhas.

Os trabalhos de Palmer et al., (2013), Dupuis et al., (2011) e Brown et al., (2006) também demonstraram que as abelhas em voo livre preferem coletar soluções de sacarose contendo baixas concentrações de nicotina, que é um derivado dos neonicotinóides, por conta da ativação

de tais receptores (nAChRs), afetando também as estruturas dos corpos pedunculados, responsáveis pela aprendizagem e memória das abelhas. A quantidade de imidacloprido utilizada dentro do período de 48 horas não foi suficiente para causar aumento ou diminuição do padrão do consumo, provavelmente por ser uma dose subletal do neonicotinóide, não atingindo quantidade suficiente para interferir no comportamento alimentar das abelhas. Contudo, embora os dados deste trabalho não indiquem que o imidacloprido afeta a sobrevivência das mandaças, doses subletais de neonicotinóides podem causar danos às abelhas, não levando à morte imediata, mas prejudicando sua fisiologia e seu comportamento (NOCELLI et al, 2012).

O uso das etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID apresenta um ponto positivo dentro do parâmetro de consumo, podendo ser utilizada em estudos de campo que visam analisar padrões de forrageamento das abelhas, como o trabalho de Nunes-Silva et al., (2020), com a espécie *Melipona fasciculata*, que buscou analisar a capacidade e distância de voo das abelhas em relação ao retorno à colônia, concluindo que o uso da tecnologia RFID permitiu uma maior precisão na coleta de dados em comparativo com técnicas tradicionais de observação.

Quanto à análise comportamental realizada pela detecção do equipamento Ethovision, que consiste num programa de computador que rastreia o comportamento animal, Kimuta et al, (2014) relataram que tais ferramentas tecnológicas se demonstraram eficientes na pesquisa etológica. Os impactos do uso da tecnologia RFID devem ser quantificados levando em consideração os aspectos relacionados à espécie que está sendo utilizada para o estudo, suas características ecológicas e o tipo de etiqueta que está sendo utilizada, bem como um comparativo com base em um grupo controle, uma vez que a confiabilidade dos dados comportamentais obtidos apenas com insetos portando etiquetas eletrônicas pode ser comprometida (BATSLEER et al., 2020).

A variável analisada referente ao estado de mobilidade total, só apresentou diferença estatística entre os grupos CA e o grupo I_RFID. Quanto à ação do solvente orgânico sob o comportamento das abelhas, Wilkins et al., (2013) destacam a importância de considerar a solubilidade da referência tóxica ao projetar estudos para que as diluições sejam feitas em um veículo ideal. Embora o CA não apresente diferença entre os demais grupos experimentais, ele apresentou uma mobilidade total maior do que o grupo que estava exposto ao agrotóxico e etiquetado, sugerindo que a presença da etiqueta significa um peso maior para as abelhas carregarem, como mencionado por Nunes-Silva et al., (2019) que discutem que tamanho da etiqueta pode representar uma restrição em relação ao tamanho das abelhas, além dos possíveis efeitos do neonicotinóide, comprometendo o estado de mobilidade das abelhas através da redução dos movimentos.

Quanto aos efeitos do solvente na mobilidade das abelhas, ainda são necessários mais estudos para compreender se a diferença observada no tamanho do efeito e sua significância seriam relevantes em um tempo maior de exposição ao agrotóxico. Os dados deste trabalho demonstraram que a exposição ao Imidacloprido deixou as abelhas em um estado Altamente Móvel por mais tempo, quando comparadas a todos os grupos que receberam a etiqueta RFID, ou seja, a etiqueta influencia na mobilidade das abelhas, independentemente de serem expostas ao imidacloprido ou não. O estudo de Schneider et al., (2012) demonstrou ao utilizar as etiquetas eletrônicas de tecnologia RFID em abelhas contaminadas com imidacloprido ($\geq 1,5$ ng/abelha), que os indivíduos demoravam mais tempo para voar e retornar até os alimentadores, e após a administração de doses mais altas desse agrotóxico (≥ 3 ng/mL), houve redução do movimento das abelhas, eventualmente levando a imobilidade e/ou movimentos trêmulos. Uma das hipóteses para explicar a maior movimentação do grupo contaminado pelo Imidacloprido no presente estudo, é a possibilidade da hiperexcitação, visualmente analisada durante as filmagens. Dentro de um período curto, a hiperexcitação desencadeia estresse energético e consequentemente a queda das atividades de mobilidade. Segundo Christen et al., (2016), o mecanismo de ação dos neonicotinóides acontece através da atuação dessas substâncias como agonistas da acetilcolina, ou seja, após ocorrer a sinapse, as moléculas inseticidas se ligam aos receptores nicotínicos da acetilcolina localizados no neurônio pós-sináptico, e o resultado disso, é um estímulo constante da mensagem da acetilcolina no sistema, que gera impulsos nervosos transmitidos continuamente, levando à hiperexcitação do sistema nervoso, podendo levar à paralisia e morte dos organismos expostos.

Todos os grupos com etiqueta foram mais lentos (ou menos Altamente Móveis) do que o Controle. Os resultados também indicaram que o controle com a etiqueta (CTL_RFID e CA_RFID) são mais lentos do que o CA. Esses resultados demonstram que há influência das etiquetas neste parâmetro de mobilidade. As alterações do estado Altamente Móvel, podem ser interpretadas como um indicativo de estresse quanto ao peso das etiquetas para a espécie *M. quadrifasciata*, diminuindo o tempo de movimentação estabelecido pelo Ethovision $< 20\%$ cm/s. Com base na literatura científica atual, Barlow et al., (2019) descrevem que as etiquetas eletrônicas pequenas podem permitir que as abelhas decole e voem normalmente, mas provavelmente impedem os comportamentos de nidificação e forrageamento (por exemplo, reduzindo a carga de néctar e pólen que as abelhas normalmente podem carregar) devido ao peso das etiquetas. Este mesmo autor propôs uma alternativa para a diminuição do peso das etiquetas utilizadas neste trabalho, reduzindo o tamanho e o peso da etiqueta para limitar os efeitos no comportamento das abelhas e aumentando a distância de detecção. O sistema RFID é usado

para detectar e rastrear os caminhos do movimento das abelhas dentro de uma rede projetada de leitores e antenas de baixo custo implementados em campo. Porém, Barlow et al., (2019) abordam a dificuldade de detecção e documentação dos movimentos rápidos de insetos voadores com rigor, como as abelhas. Com base no que foi descrito, para os estudos de campo que queiram rastrear o forrageamento, a etiqueta é suficiente para detectar a mobilidade das abelhas (NUNES-SILVA et al., 2019; TOPPA et al., 2021). Porém em estudos comportamentais que avaliam as nuances do comportamento *in vitro* pela abordagem do Ethovision, as etiquetas podem influenciar na mobilidade das abelhas, e tais influências se tornam ainda mais evidentes ao ajustar os parâmetros de refinamento do programa.

Na pesquisa de De Souza et al., (2018), também foi demonstrado que a presença da etiqueta RFID em uma abelha pode afetar alguns de seus comportamentos, a impedindo de voar (por conta da etiqueta de RFID estar tocando uma das asas), prejudicando sua navegação (se estiver cobrindo os olhos) ou machucando no momento da colagem ao pressionar seu tórax. O trabalho de Kimmel et al., (2007) menciona que um dos distúrbios associados à fixação das etiquetas eletrônicas em abelhas é a redução da mobilidade dos animais dentro da colônia, sugerindo que há interferência da radiação eletromagnética das etiquetas no comportamento das abelhas em estudos de campo. Essa hipótese se sustenta ao analisar o parâmetro de Mobilidade Total, o qual permitiu observar que o grupo exposto ao neonicotinóide juntamente com a etiqueta RFID apresentou um estado de mobilidade geral menor que o Controle, indicando que a presença da etiqueta induziu a diminuição da mobilidade mesmo no grupo exposto ao imidacloprido.

Comparando os resultados entre os parâmetros Imóvel e Móvel, pode-se perceber que eles indicam a mesma tendência com os grupos expostos ao imidacloprido, com e sem a etiqueta RFID, apresentando menor mobilidade quando comparados com as abelhas do controle com acetona. Tal resultado sugere que a presença da acetona, embora esteja dentro do limite permitido (5%), pode ter causado um aumento da mobilidade das abelhas, ou ainda, que, embora o imidacloprido cause hiperexcitação, neste caso, as abelhas podem ter apresentado mobilidade reduzida em decorrência da movimentação rápida, desencadeando um alto gasto de energia. Assim, com a exaustão, as abelhas podem ter diminuído seu estado de mobilidade.

Em relação aos dados sobre o estímulo luminoso, de acordo com a literatura, Masami et al., (2013) explicam que a maioria dos insetos tem dois tipos de órgãos fotorreceptores, olhos compostos e ocelos. Os olhos compostos são constituídos por muitas unidades sensíveis à luz denominadas omatídios. Um olho composto normalmente contém três tipos de células fotorreceptoras com sensibilidade espectral com picos nas regiões de comprimento de onda UV, azul

e verde, respectivamente, presentes em abelhas, além disso, existem respostas típicas de insetos à luz, como a fototaxia positiva e a fototaxia negativa (RIDDLE, 2016). Dentro do espectro do presente estudo, foi avaliado se a resposta ao estímulo natural de atração à luz seria afetada pela presença do neonicotinóide e das etiquetas RFID, mas não foram observadas interferências desses dois fatores durante visitas e revisitações à luz, pois todos os grupos responderam igualmente a esse estímulo. Provavelmente, a baixa concentração do agrotóxico e o curto tempo de exposição não foram capazes de induzir uma resposta diferenciada nas abelhas, e mesmo com o peso extra das etiquetas, as abelhas respondiam de forma igual à luz. Desta mesma forma, não foram observadas diferenças entre os grupos em relação à frequência de visita ao alimentador. Mesmo utilizando mel para aumentar a atratividade e deixando as abelhas em jejum por 15 minutos, a visita ao alimentador foi baixa em todos os grupos. Uma das hipóteses é que não houve tempo de aclimação nas arenas, uma vez que esperava-se observar a resposta imediata aos estímulos fornecidos, seguindo as recomendações de (TADEI et al., 2019). Com isso, as abelhas podem não ter tido tempo suficiente para o reconhecimento do alimentador nas arenas, tendendo a seguir primeiramente ao estímulo luminoso, seguindo o comportamento esperado de fototaxia desses insetos.

As etiquetas de tecnologia RFID não influenciaram na mobilidade das abelhas em relação ao consumo do xarope, mortalidade, distância percorrida e velocidade média. Porém, foram capazes de influenciar na mobilidade associada ao agrotóxico imidacloprido. No estudo de Jacob et al., (2019) é relatado que os neonicotinóides acetamiprida, imidacloprido e tiacloprido em concentrações letais medianas LC_{50} testados, afetaram a velocidade, distância percorrida, duração e frequência de repouso e mobilidade contínua nas espécies *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica* e o imidacloprido causou a maior redução na velocidade média (~2 vezes) em relação ao grupo controle. Esses resultados corroboram o que foi encontrado no presente estudo, uma vez que o grupo exposto ao imidacloprido também teve sua mobilidade afetada, o que ficou ainda mais evidente na presença da etiqueta RFID.

É importante ressaltar que os parâmetros de mobilidade foram definidos pelo Ethovision® XT - 60% > cm/s altamente móvel e <20% cm/s imóvel - utilizado para insetos (artrópodes), e que o software foi concebido inicialmente para exercer a função de registrar automaticamente o comportamento de pequenos mamíferos, como ratos e camundongos, abrindo a possibilidade de exploração para estudos que envolvam outros animais. O sistema permite ser configurado para atender uma ampla gama de parâmetros mensuráveis e selecionar ensaios inteiros ou partes para análise (NOLDUS, 2001). Porém, tais parâmetros só podem ser calculados com o módulo

de vários pontos do corpo do animal, como a direção da cabeça em relação ao nariz e alongamento do corpo, apresentando certa dificuldade de aplicação em animais tão pequenos como as abelhas. Com isso, a movimentação detectada nas abelhas consiste somente nos comportamentos de voo dentro da arena e caminhada, e existe uma deficiência para distinguir movimentos mais sutis como a antenação. Isso indica que, talvez, as etiquetas tenham um melhor proveito em experimentos de campo do que em experimentos comportamentais analisados no Ethovision, por conta do refinamento e sensibilidade do software, salientando a necessidade de estudos complementares.

6 CONCLUSÕES

As etiquetas eletrônicas não demonstraram interferir nos padrões de consumo do alimento e sobrevivência das abelhas durante o período de 48h de exposição. No entanto, os dados acerca da análise comportamental dos indivíduos da espécie *Melipona quadrifasciata* denotam que as etiquetas eletrônicas apresentam influência na mobilidade em grupos associados ao agrotóxico imidacloprido, podendo indicar uma relação entre o estresse causado pelo peso das etiquetas e os possíveis efeitos da dose subletal do neonicotinóide (10 ppb).

Também vale ressaltar a relevância de estudos futuros utilizando diferentes espécies de abelhas nativas, com a finalidade de compreender o processo de adaptação e suporte do peso das etiquetas de acordo com características morfológicas variadas, visando otimizar e minimizar o estresse, além de evadir dados destoantes, como uma maneira de controle da influência dos fatores explorados.

Devido à natureza sensível dessa tecnologia, ainda não é possível fornecer detalhes específicos sobre como as etiquetas podem ser aperfeiçoadas, porém esperamos que os dados coletados através deste estudo colaborem para a otimização e entendimento da tecnologia de RFID para estudos comportamentais futuros.

7 REFERÊNCIAS

ABOU-SHAARA, H. F. et al., A review of impacts of temperature and relative humidity on various activities of honey bees. **Insectes Sociaux**, v. 64, n. 4, p. 455–463, 6 jul. 2017.

ALIOUANE, Y. et al., subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 113, 2009.

ALKASSAB, A. T.; KIRCHNER, W. H. Impacts of chronic sublethal exposure to clothianidin on winter honeybees. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 5, p. 1000–1010, 18 abr. 2016.

ALMEIDA, M. D. et al., A flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos e os riscos à saúde humana: análise do Projeto de Lei nº 3.200/2015. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 7, 2017.

ANVISA, T. D. P., VIGILÂNCIAS, C., DO AC, S. D. E., DF, E., GO, M., RJ, R., & SP, I. (2008). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA).

BARLOW, S. E.; O'NEILL, M. A.; PAVLIK, B. M. A prototype RFID tag for detecting bumblebee visitations within fragmented landscapes. **Journal of Biological Engineering**, v. 13, n. 1, 7 fev. 2019.

BATSLEER, F. et al., The neglected impact of tracking devices on terrestrial arthropods. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 350–361, 25 fev. 2020.

BENAETS, K. et al., Covert deformed wing virus infections have long-term deleterious effects on honeybee foraging and survival. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1848, 8 fev. 2017.

BIBI, F. et al., A review: RFID technology having sensing aptitudes for food industry and their contribution to tracking and monitoring of food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 91–103, abr. 2017.

BURRILL, R. M.; DIETZ, A. The response of Honey Bees to variations in solar radiation and temperature. **Apidologie**, v. 12, n. 4, p. 319-328, 1981.

BRITO, et al., The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 38654-38661, 2020.

BROMENSHENK, J. et al., Bees as Biosensors: Chemosensory Ability, Honey Bee Monitoring Systems, and Emergent Sensor Technologies Derived from the Pollinator Syndrome. **Biosensors**, v. 5, n. 4, p. 678–711, 30 out. 2015.

BROWN, L. A. et al., Neonicotinoid insecticides display partial and super agonist actions on native insect nicotinic acetylcholine receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 99, n. 2, p. 608–615, out. 2006.

CHAKRABARTI, P.; SARKAR, S.; BASU, P. Pesticide induced visual abnormalities in Asian honey bees (*Apis cerana L.*) in intensive agricultural landscapes. **Chemosphere**, v. 230, p. 51–58, set. 2019.

CHAM, K. et al., Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília: Iba-ma/Diqua. v. 114, [s.d.].

CHAM, K. O. et al., Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 36–48, 2019.

CHAUZAT, M.-P. et al., A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 2, p. 253–262, 2006.

CHRISTEN, V.; MITTNER, F.; FENT, K. Molecular Effects of Neonicotinoids in Honey Bees (*Apis mellifera*). **Environmental science & technology**, v. 50, n. 7, p. 4071–4081, 2016.

CLAUSEN, M. A.; ELLE, E.; SMUKLER, S. M. Evaluating hedgerows for wild bee conservation in intensively managed agricultural landscapes. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 326, n. 107814, p. 107814, 2022.

COLLA, S. R. The potential consequences of ‘bee washing’ on wild bee health and conservation. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 18, p. 30–32, 2022.

CSIRO - Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, **csiro.au**, 2019.
DA CRUZ LANDIM, Carminda. Abelhas: morfologia e função de sistemas. **SciELO-Ed. UNESP**, 2009.

DE ASSIS, J. Are native bees in Brazil at risk from the exposure to the neonicotinoid imidacloprid? **Environmental Research**, v. 212, 2022.

DE LIMA, C. et al., Effects of the Neonicotinoid Imidacloprid on the Feeding Behavior of *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. **Revista Agrogeoambiental**, v. 12, n. 1, 2020.

DE OLIVEIRA, J.; RENATA, C. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, p. 65–70, 2019.

SOUZA, D. E. Low-cost electronic tagging system for bee monitoring. **Sensors**, v. 18, 2018.

DECOURTYE, A. et al., Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 20, n. 2, p. 429–437, 2011.

DICKS, L. V. et al., Author Correction: A global-scale expert assessment of drivers and risks associated with pollinator decline. **Nature ecology & evolution**, v. 5, n. 10, p. 1462, 2021.

DUPUIS, J. et al., Expression patterns of nicotinic subunits $\alpha 2$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, and $\beta 1$ affect the kinetics and pharmacology of ACh-induced currents in adult bee olfactory neuropiles. **Journal of neurophysiology**, n. 4, p. 1604–1613, 2011.

- EL HASSANI, A. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thia-methoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of environmental con-tamination and toxicology**, p. 653–661, 2008.
- ELBERT, A. et al., Imidacloprid-a new systemic insecticide. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, n. 5, p. 32–33, 1991
- GOMES, I. Honeybee survival and flight capacity are compromised by in-secticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 97–107, 2020.
- GOTELLI, N. J. ;.; ELLISON, A. M. Princípios de estatística em ecologia. **ART-MED editora**, 2016
- GUEZ, D. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7-and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). **Neurobiology of learning and memory**, p. 183–191, 2001.
- HO, J. et al., **Moving beyond P values: Everyday data analysis with estimation plots**. 2018.
- HRNCIR, M. ;.; STEFAN, ;.; FRIEDRICH, G. Stingless bees (Meliponini): sens-es and behavior. **Journal of Comparative Physiology A**, n. 9, p. 597–601, 2016.
- IBAMA - Avaliação de risco ambiental do ingrediente ativo imidacloprido para insetos polinizadores parecer técnico nº sei IBAMA 6220406.
- JACOB, C. R. O. et al., Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology (London, England)**, v. 28, n. 7, p. 744–753, 2019.
- JAFFÉ, R. et al., Landscape genomics to the rescue of a tropical bee threatened by habitat loss and climate change. **Evolutionary applications**, v. 12, n. 6, p. 1164–1177, 2019.
- JEANMART, S. et al., Synthetic approaches to the 2010-2014 new agrochemicals. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 24, n. 3, p. 317–341, 2016.
- JIANG, X. The effect of neonicotinoid insecticide and fungicide on sugar re-sponsiveness and orientation behavior of honey bee (*Apis mellifera*) in semi-field condi-tions. **Insects**, v. 9, 2018.
- KESSLER, S. C. et al., Corrigendum: Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, v. 533, n. 7602, p. 278, 2016.
- KIMURA, T. et al., Development of a new method to track multiple honey bees with complex behaviors on a flat laboratory arena. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e84656, 2014
- MASAMI, ;.; HONDA, K.-. Insect reactions to light and its applications to pest management. **Applied Entomology and Zoology**, n. 4, p. 413–421, 2013.
- MEDRZYCKI, P. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, v. 56, p. 59–62, 2003.

MINAHAN, D. F.; BRUNET, J. Strong interspecific differences in foraging activity observed between honey bees and bumble bees using miniaturized radio frequency identification (RFID). **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 6, 2018.

MOURE, J. S. Notas sobre as espécies de *Melipona* descritas por Lepeletier em 1836 (Hymenoptera - Apidae). **Thi Nha et al., A real-time imaging system for multiple honey bee tracking and activity monitoring. Computers and Electronics in Agriculture**, v. 35, 1975.

NOCELLI, R. C. et al., Riscos de pesticidas sobre as abelhas. *Semana dos Polinizadores*, v. 3, p. 196-212, 2012.

NOLDUS, L. P.; SPINK, A. J. ;; RUUD, A. J. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. **Behavior Research Methods, Instruments, & Computers**, v. 33, p. 398–414, 2001.

NUNES-SILVA, P. et al., Applications of RFID technology on the study of bees. **Insectes sociaux**, v. 66, n. 1, p. 15–24, 2019.

NUNES-SILVA, P. et al., Radiofrequency identification (RFID) reveals long-distance flight and homing abilities of the stingless bee *Melipona fasciculata*. **Apidologie**, v. 51, n. 2, p. 240–253, 2020.

OECD 213, 1998 Guideline for the testing of chemicals; Honey bees; acute oral toxicity test.

OECD. Guideline for the testing of chemicals. Test No. 237 (2013) Honey Bee (*Apis Mellifera*).

OECD. Test No. 245: Honey Bee (*Apis Mellifera L.*), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. 2017.

OECD. Test No. 247: Bumblebee, Acute Oral Toxicity Test, OECD Guidelines for the **Testing of Chemicals**, Section 2, No. 247. 2017.

OLIVEIRA, F. Guia ilustrado das abelhas" sem ferrão. **das Reservas Amanã e Mamirauá**, 2013.

PALMER, M. J. et al., Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. **Nature communications**, v. 4, p. 1634, 2013.

PAUDEL, Y. Honey bees (*Apis mellifera L.*) and pollination issues: Current status, impacts, and potential drivers of decline. **Journal of Agricultural Science**, n. 6, 2015.

SILVIA, R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, p. 348–354, 2014.

RAMIREZ-ROMERO, R. ;; CHAUF AUX, J. ;; PHAM-DELÈGUE, M.-H. Effects of Cry1Ab protoxin, deltamethrin and imidacloprid on the foraging activity and the learning performances of the honeybee *Apis mellifera*, a comparative approach. **Apidologie**, n. 4, p. 601–611, 2005.

RIDDLE, S. How bees see and why it matters. **Bee Culture: The Magazine of American Bee Keeping**. [s.l: s.n.] 2016.

ROUBIK, D. W. ;; SCHWARZ, H. F. The genus *Melipona* the type genus of the Meliponidae or stingless bees. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist**, v. 63, n. 2, p. 231–460, 1932.

SCHWARZ, H. F. The genus *Melipona* the type genus of the Meliponidae or stingless bees. **Bull. Am. Mus. Nat. Hist**, v. 63, n. 4, p. 231–460, 1932.

SCHNEIDER, C. W. et al., RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30023, 2012.

SGOLASTRA, F. Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, 2020.

SILVA, W.; PEREIRA, ;; PAZ, J. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza online**, p. 146–152, 2012.

SPADOTTO, C. A. et al., Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. 2004.

STONER, K. A. ;; BRIAN, D. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). **PloS one**, n. 6, 2012.

SUSANTO, F. et al., Addressing RFID misreadings to better infer bee hive activity. **IEEE access: practical innovations, open solutions**, v. 6, p. 31935–31949, 2018.

TADEI, R. et al., Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 3277, 2019.

TAVARES, M. G., Lopes, D. M., & Campos, L. A. O. (2017). An overview of cytogenetics of the tribe Meliponini (Hymenoptera: Apidae). **Genetica**, 145(3), 241-258.

TOMÉ HVV, Barbosa WF, Martins GF, Guedes RNC (2015) Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable nontarget toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere** 124:103–109.

TOMÉ, H. V. V. et al., Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38406, 2012.

TOPPA, R. H. et al., Impact of glues used for RFIDs on the longevity and flight muscles of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, v. 52, n. 2, p. 328–340, 2021.

VAN GEYSTELEN, A. et al., Track-a-Forager: a program for the automated analysis of RFID tracking data to reconstruct foraging behaviour. **Insectes sociaux**, v. 63, n. 1, p. 175–183, 2016.

WILKINS, S. Effects of solvent on the toxicity of dimethoate in a honeybee in vitro larval study. **Pest management science**, p. 462–463, 2013.

ZATTARA, E. E.; AIZEN, M. A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. **One Earth**, v. 4, n. 1, p. 114–123, 2021.