

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

GRAZIELE CAMPANA GRANDO

**EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE AGROTÓXICOS
GLIFOSATO E IMIDACLOPRIDO NO DESENVOLVIMENTO,
SISTEMA IMUNOLÓGICO E DIGESTÓRIO DE ABELHAS**

***Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807)**

Araras

2022

GRAZIELE CAMPANA GRANDO

**EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE AGROTÓXICOS
GLIFOSATO E IMIDACLOPRIDO NO DESENVOLVIMENTO,
SISTEMA IMUNOLÓGICO E DIGESTÓRIO DE ABELHAS
Scaptotrigona postica (Latreille, 1807)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agricultura e Ambiente do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras-SP como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Araras

2022

Campana Grando, Grazielle

Efeitos da combinação de agrotóxicos glifosato e imidacloprido no desenvolvimento, sistema imunológico e digestório de abelhas *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) / Grazielle Campana Grando -- 2022.
92f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Banca Examinadora: Ricardo Toshio Fujihara, Caio Eduardo da Costa Domingues

Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Abelhas nativas. 3. Toxicidade crônica. I. Campana Grando, Grazielle. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Grazielle Campana Grando, realizada em 15/12/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara (UFSCar)

Prof. Dr. Caio Eduardo da Costa Domingues (University of Maribor)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me ajudaram para realização do meu trabalho, em especial:

À Profa. Dra. Roberta, minha orientadora, por sua participação ativa imprescindível durante todo o projeto de pesquisa e que sem seu apoio não estaria aqui realizando este trabalho;

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro pela concessão de espaço para execução dessa pesquisa; em especial à Adna, por todo acolhimento, amizade, e principalmente por todos sábados, domingos e feriados dedicados a me ajudar com os bioensaios;

À UFSCar pela oportunidade de cursar uma pós-graduação e a todos os professores que tornaram essa jornada possível;

Ao programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, pela experiência acadêmica e realização desse trabalho;

A todos colegas do Laboratório de Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAS);

Aos órgãos de fomento à pesquisa, Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (código de financiamento 001) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro para realização dos bioensaios;

Aos meus pais Valdir e Teresa, meu marido Guilherme, sempre presentes na minha vida.

Agradeço à Deus por ter me permitido realizar este trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS	16
4. REFERÊNCIAS	17
5. CAPITULO 1 – Desenvolvimento de um método para bioensaios toxicológicos <i>in vivo</i> para larvas de abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona postica</i>	25
5.1. INTRODUÇÃO	25
5.2. OBJETIVO	27
5.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.3.1. Meliponário e coleta das abelhas.....	27
5.3.2. Bioensaio 1 (Desoperculação e desenvolvimento das larvas).....	29
5.3.3. Bioensaio 2 (Introdução do alimento larval <i>in vivo</i>).....	30
5.3.4. Bioensaio 3 (Introdução do alimento larval <i>in vitro</i>).....	32
5.4. RESULTADOS.....	33
5.4.1. Bioensaio 1 (Desoperculação e desenvolvimento das larvas).....	33
5.4.2. Bioensaio 2 (Introdução do alimento larval <i>in vivo</i>).....	35
5.4.3. Bioensaio 3 (Introdução do alimento larval <i>in vitro</i>).....	36
5.5. DISCUSSÃO.....	38
5.6. CONCLUSÃO	41
5.7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	42
6. CAPITULO 2 – Efeitos da combinação de herbicida e inseticida em abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona postica</i>	46
6.1. INTRODUÇÃO	46
6.2. OBJETIVOS.....	48

6.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
6.3.1. Bioensaio <i>in vitro</i>	49
6.3.2. Desenvolvimento das abelhas <i>S. postica</i>	53
6.3.3. Morfometria das abelhas recém-emergidas.....	54
6.3.4. Imunocompetência das abelhas.....	54
6.3.5. Histologia do intestino médio das abelhas recém-emergidas.....	55
6.3.6. Análise Estatística.....	58
6.4. RESULTADOS.....	59
6.4.1. Desenvolvimento das abelhas sem ferrão.....	59
6.4.2. Morfometria das abelhas recém-emergidas.....	61
6.4.3. Imunocompetência das abelhas adultas.....	64
6.4.4. Histologia do intestino médio das abelhas recém-emergidas.....	67
6.5. DISCUSSÃO.....	69
6.6. CONCLUSÃO.....	75
6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
7. CONCLUSÃO GERAL.....	87

RESUMO

Estudos têm demonstrado que a diminuição da população de abelhas está associada a múltiplos fatores, sendo a exposição aos agrotóxicos o principal fator no Brasil. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos de concentrações residuais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, de forma isolada e combinada, sobre o desenvolvimento, o sistema imune e o sistema digestório das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica*. Diante dessa realidade, bioensaios *in vivo* foram conduzidos a fim de desenvolver um método para avaliar a toxicidade dos agrotóxicos em abelhas sem ferrão. Primeiramente, introduzimos, dentro da colônia, diferentes materiais (cera + parafilm e cerume) para vedar as células de cria desoperculadas e observamos a aceitação desses materiais pelas abelhas. No segundo e terceiro bioensaio, testamos a aplicação do alimento larval com diferentes tipos de agulhas nas células de cria (sem desopercular) tanto na colônia quanto no disco de cria colocado na incubadora. Devido ao comportamento higiênico altamente eficiente e a alta proliferação dos fungos no discos de cria na incubadora, obtivemos índice de emergência igual a zero, não sendo possível estabelecer um método adequado para realização dos testes de toxicidade *in vivo*. O desenvolvimento desse método demanda estudos mais profundos sobre o microecossistema existente na colônia e a biologia da *S. postica*. Na segunda parte do trabalho, realizamos os bioensaios *in vitro*. As larvas de *S. postica* foram alimentadas com o alimento larval contendo os agrotóxicos nas seguintes concentrações: D1 – controle (alimento larval sem adição dos ingredientes ativos), D2 – 0,2 ng/μL de glifosato, D3 – 0,2 ng/μL de imidacloprido e D4 – 0,2 ng/μL de glifosato + 0,2 ng/μL de imidacloprido e seu desenvolvimento foi observado até sua emergência. Foram avaliados parâmetros biológicos, como taxa de mortalidade, pupação, defecação e emergência das abelhas. Também avaliamos parâmetros morfométricos da largura da cabeça e distância intertegular, número de células do sistema imune e a histoarquitetura do intestino médio das abelhas. Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas utilizando-se o software RStudio. Os resultados demonstraram que o imidacloprido afetou significativamente as taxas de sobrevivência das larvas, enquanto os demais grupos não apresentaram alteração. A morfometria da distância intertegular e largura da cabeça foram afetadas pelo

glifosato, a mistura apresentou alteração apenas na medida da cabeça e o imidacloprido não apresentou para nenhum dos dois parâmetros. Não houve alteração do número dos hemócitos para as larvas exposta aos grupos experimentais. Já para as abelhas recém-emergidas, a exposição ao imidacloprido e mistura afetou significativamente a densidade de hemócitos. Os resultados das alterações morfológicas do intestino médio demonstraram danos ao órgão nos grupos experimentais (D2, D3 e D4). Foram observados perda do material citoplasmático, perda da borda em escova e eliminação de células para o lúmen. Dessa forma, concluímos que o glifosato pode afetar o tamanho dos indivíduos e o funcionamento do intestino. Já o imidacloprido pode comprometer a sobrevivência das abelhas, o sistema imunológico das abelhas e o sistema digestório. E por último a mistura dos agrotóxicos, não causou a soma dos efeitos dos ingredientes ativos, mas apresentou efeitos subletais sobre o tamanho do indivíduo, no sistema imunológico e no sistema digestório. Os dados obtidos indicam a necessidade de atenção ao processo de avaliação de risco de agrotóxicos para abelhas, incluído as nativas. E também contribui com o conhecimento acerca das nossas espécies de abelhas sem ferrão.

Palavras-chaves: toxicidade crônica, desenvolvimento larval, hemolinfa, morfofisiologia, herbicida, inseticida

ABSTRACT

Studies have shown that the decrease in the bee population is associated with multiple factors, with exposure to pesticides being the main factor in Brazil. Thus, the objective of this work was to evaluate the possible effects of residual concentrations of the herbicide glyphosate and the insecticide imidacloprid found, in an isolated and combined form, on the development, the immune system and the digestive system of stingless bees *Scaptotrigona postica*. For this, *in vivo* bioassays were conducted to develop a method to evaluate the toxicity of pesticides in stingless bees. First, we introduced, inside the colony, different materials (wax + parafilm and cerumen) to seal the uncapped brood cells and observed the acceptance of these materials by the bees. In the second and third bioassays, we tested the application of larval food with different types of needles in the brood cells (without uncapping) both in the colony and in the brood disc placed in the incubator. Due to the highly efficient hygienic behavior and the high proliferation of fungi in the brood discs in the incubator, we obtained an emergence index equal to zero, and it was not possible to establish an adequate method for carrying out the *in vivo* toxicity tests. The development of this method requires deeper studies on the existing micro-ecosystem in the colony and the biology of *S. postica*. In the second part of the work, we performed *in vitro* bioassays. *S. postica* larvae were fed with larval food containing pesticides at the following concentrations: D1 – control (larval food without the addition of active ingredients), D2 – 0.2 ng/ μ L of glyphosate, D3 – 0.2 ng/ μ L of imidacloprid and D4 – 0.2 ng/ μ L of glyphosate + 0.2 ng/ μ L of imidacloprid and its development was observed until emergence. Biological parameters were evaluated, such as mortality rate, pupation, defecation, and bee emergence. We also evaluated morphometric parameters of head width and intertegular span distance, the number of cells of the immune system, and the histoarchitecture of the midgut. The data obtained were submitted for statistical analysis using the RStudio software. The results showed that imidacloprid significantly affected the survival rates of the larvae, while the other groups did not change. The morphometry of the intertegular span distance and width of the head was affected by glyphosate, the mixture only showed changes in the measurement of the head and imidacloprid did not show any of the two parameters. There was no change in the number of hemocytes for the larvae exposed to the experimental groups. As for newly

emerged bees, exposure to imidacloprid and mixture significantly affected hemocyte density. The results of the morphological alterations of the midgut showed damage to the organ in the experimental groups (D2, D3, and D4). Loss of cytoplasmic material, loss of brush border, and elimination of cells into the lumen were observed. Thus, we conclude that glyphosate can affect the size of individuals and the functioning of the intestine. Imidacloprid can compromise the survival of bees, the immune system of bees, and the digestive system. And finally, the mixture of pesticides did not cause the sum of the effects of the active ingredients but had sublethal effects on the individual's size, the immune system, and the digestive system. The data obtained indicate the need for attention to the risk assessment process of pesticides for bees, including native ones. It also contributes to knowledge about our species of stingless bees.

Keywords: chronic toxicity, larval development, hemolymph, morphophysiology, herbicide, insecticide

1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas ao longo dos anos estabeleceram relações estreitas com as plantas, onde ambas se beneficiam, as abelhas adquirem os recursos florais e as plantas o serviço de polinização, devido a adaptações seletivas durante a evolução, observadas na morfologia e comportamento das abelhas e nos diferentes tipos de flores (PINHEIRO et al., 2016). Assim, as abelhas formam o maior grupo de polinizadores bióticos e contemplam cerca de 48% do total de espécies identificadas como visitantes florais de cultivos agrícolas (BPBES/REBIPP, 2019).

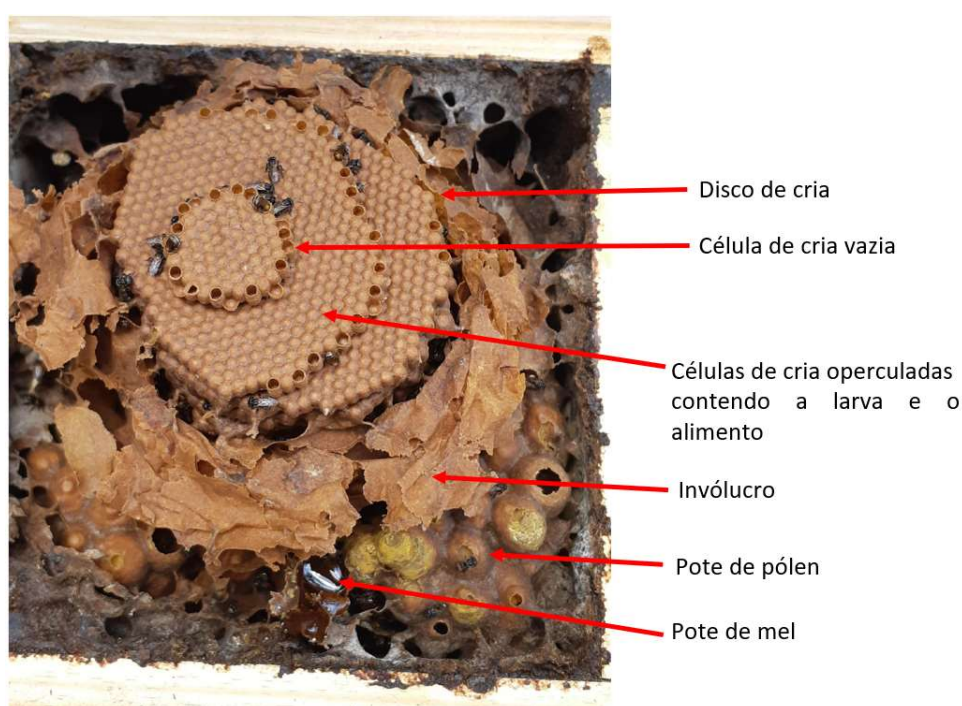
Por meio da atividade de forrageamento, as abelhas coletam néctar, pólen, água e outros recursos como óleos essenciais para manutenção da colônia. Elas visitam um grande número de flores para suprir as necessidades coletivas (CORBET et al., 1991). Deste modo, o desenvolvimento de quase todo o ecossistema terrestre está ligado à polinização das abelhas, devido ao seu papel na reprodução de inúmeras espécies de vegetais (KEVAN, 1999). Além disso, as abelhas também são extremamente importantes para agricultura, permitindo ou aumentando a produção de sementes e frutos em muitas culturas e melhorando a qualidade e peso dos frutos (MARZINZIG et al., 2018), como é o caso do tomate (DEL SARTO et al., 2005), pepino (DOS SANTOS et al., 2008) e morango (MALAGODI-BRAGA, 2018).

Do grupo das abelhas sociais, as abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) compõe o mais diverso e numeroso grupo (MICHENER 2007) e são encontradas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo predominantes no território Latino Americano (NOGUEIRA-NETO, 1997). Possuem mais de 500 espécies descritas (MICHENER 2013), sendo o Brasil, o país, com maior riqueza de espécies (244 espécies) cerca de 87 espécies são endêmicas (NOGUEIRA-NETO, 1997; PEDRO et al., 2014; SILVA et al., 2014).

Dentre as espécies de abelhas sem ferrão, o gênero *Scaptotrigona* é composto por cerca de 22 espécies descritas (FERNÁNDEZ, 2008) e a espécie *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) localiza-se em todo o território nacional (PEDRO et al., 2014), pertencente à tribo Meliponini, conhecida popularmente como abelha Mandaguari, devido a entrada de sua colônia ser construída em formato tubular (LEÃO et al. 2016). Comumente é mantida pelos meliponicultores devido à sua facilidade de manejo,

colônias populosas (com mais de 15.000 abelhas adultas), ótima em produção de mel e com potencial uso na polinização de culturas, como café e açaí (JAFFÉ et al. 2015; LEÃO et al. 2016). Nidificam em cavidades pré-existent, como os ocos das árvores e constroem suas células de cria justapostas umas às outras, formando discos compactos, helicoidais e horizontais (MICHENER, 2007; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Figura 1 – Colônia de *Scaptotrigona postica* vista por dentro. É possível observar as estruturas: os potes de méis, o invólucro, disco de cria, célula de cria vazia e células de cria operculadas contendo as larvas e o alimento larval (Autoria própria).



S. postica realiza um papel importante na polinização de plantas nativas no Brasil, como por exemplo, *Euterpe oleracea* (Arecaceae), conhecida popularmente como açaí. Visitam as flores dos dois sexos do açaizeiro permitindo assim a polinização cruzada (MUTO et al., 2020). Quando suas colônias são manejadas em plantações, chegam a aumentar a produção do açaí em até 2,5 vezes (BEZERRA et al., 2020; MUTO et al., 2020). Ela também é utilizada como espécie modelo para teste de toxicidade larval com abelhas nativas (ROSA-FONTANA et al., 2020). Tem comportamento e ciclo de vida diferentes da abelha exótica *Apis mellifera*, que é a abelha utilizada na avaliação de risco ambiental de agrotóxico pelo Instituto Brasileiro

do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e sobre as quais encontram-se a maioria dos estudos.

Nas últimas décadas, a mudança no uso da terra e intensificação do manejo do solo, principalmente na agricultura, levaram a declínios alarmantes das abelhas e nos serviços ecossistêmicos (ABATI et al., 2021; ALTHAUS et al., 2020; CAMPBELL et al., 2022; DROSSART e GÉRARD et al., 2020; ODANAKA e REHAN, 2019; SGOLASTRA et al., 2020; VEGA-HIDALGO et al., 2020; ZATTARA e AIZEN, 2021). Essa diminuição tem sido relacionada a diversos fatores estressores, mas principalmente à exposição aos agrotóxicos (BIESMEIJER e SLAA, 2006; GOULSON et al., 2015; HAVARD et al. 2020; PIRES et al., 2016). Dessa maneira, tornam-se necessários estudos para avaliar os impactos letais e subletais dos agrotóxicos para as abelhas através de estudos agudos e crônicos (ALVARENGA et al., 2020; ELLIS et al., 2010; WILLIANS, 1995).

Durante o forrageamento as abelhas ficam expostas a diferentes classes de agrotóxicos, pois muitos agricultores misturam os agrotóxicos para ter maior eficácia do produto e diminuir no número de aplicações (PETTER et al., 2012). Por conseguinte, as abelhas coletam o pólen e o néctar com vários tipos de resíduos de agrotóxicos e levam para dentro das colônias (CHAM et al., 2020) onde são encontrados nos alimentos da rainha e das larvas (PRADO et al., 2020). Sendo comum encontrar a presença de dois ou mais ingredientes ativos em pólen, mel e nas próprias abelhas (KASIOTIS et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

Os agrotóxicos são utilizados na agricultura brasileira principalmente para controle de pragas, doenças e plantas indesejáveis na cultura, abrangendo muitas moléculas, com diferentes modos de ação e toxicidade (SILVA e FAY, 2004). Podem ser divididos em três principais classes: inseticidas, herbicidas e fungicidas (SILVA. FAY, 2004), sendo os herbicidas e inseticidas mais relevantes para esse trabalho.

Os herbicidas são utilizados no manejo de plantas indesejáveis, agem bloqueando a biossíntese de aminoácidos, carotenoides ou lipídeos, afetando a divisão celular das plantas ou bloqueando o fluxo de elétrons fotossintéticos (TAIZ et al., 2017). Já os inseticidas têm o objetivo de repelir e controlar os insetos, agem como moduladores competitivos dos receptores nicotínicos da acetilcolina, moduladores alostéricos dos receptores nicotínicos da acetilcolina, moduladores de canais de

sódio, bloqueadores de canais de cloro mediados pelo ácido gama-aminobutírico e inibidores da acetilcolinesterase, entre outros (SILVA e FAY, 2004).

Entre os herbicidas, o glifosato é o ingrediente ativo mais vendido no mundo e o primeiro no ranking da comercialização no Brasil (IBAMA, 2020). O glifosato (N-(phosphonomethyl)glycine) possui uma rápida translocação das folhas tratadas para as raízes, rizomas e meristemas apicais, que resulta na morte das plantas (YAMADA e CASTRO, 2007). Sua utilização está regulamentada para as culturas onde é possível observar a visita de abelhas como café, cana-de-açúcar, citros e eucalipto (AGROFIT, 2022; BPBES/REBIPP, 2019).

Embora o glifosato seja considerado pouco tóxico para as abelhas (PPDB, 2022), muitos estudos destacam que a exposição pode acarretar efeitos subletais, como diminuição do peso larval, da taxa de sobrevivência de larvas e abelhas imaturas, perturbação da microbiota intestinal benéfica afetando potencialmente a saúde das abelhas e sua eficácia como polinizadores (BATTISTI et al., 2021; BERNARDES et al., 2022; DAI et al., 2018; MOTTA et al., 2020; VÁZQUEZ et al. 2018;).

Já o inseticida imidacloprido, está entre os dez ingredientes ativos mais comercializados no Brasil (IBAMA, 2020). O imidacloprido (1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine) é sistêmico na planta e no inseto é agonista da acetilcolina e age no sistema nervoso do inseto por meio do bloqueio dos receptores pós-sinápticos da acetilcolina (TOMIZAWA e CASIDA, 2005). Pode ser empregado no controle de vários insetos, no tratamento de sementes, aplicação foliar, no solo, no tronco (AGROFIT, 2022) e até para controle de pulgas em animais domésticos (TOMIZAWA e CASIDA, 2005). Sua utilização também está regulamentada para as culturas onde é comum a visita de abelhas como café, cana-de-açúcar, citros, eucalipto e maracujá (AGROFIT, 2022; BPBES/REBIPP, 2019).

O imidacloprido é classificado como altamente tóxico para abelhas (PPDB, 2022) e além de seu efeito tóxico, também apresenta efeitos subletais em doses residuais, tais como diminuição da capacidade de aprendizado olfativo, desorientação de voo, distúrbios na locomoção e comprometimento do forrageamento (AL NAGGAR et al., 2022; LI et al., 2019; SANTOS et al., 2018; TOMÉ et al., 2012).

Os neonicotinoides podem ainda afetar a imunidade humoral das abelhas (ANNOSCIA et al., 2020). Efeitos sinérgicos são esperados pela combinação dos agrotóxicos causando a imunossupressão, evidenciada pela diminuição da quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa (AMARAL et al., 2010; RAVAIANO et al., 2018). Os hemócitos desempenham uma grande variedade de funções, entre elas, a defesa contra patógenos e parasitas que conferem imunidade celular para as abelhas (CRUZ-LADIM, 2009). A diminuição da imunocompetência pode tornar as abelhas mais susceptíveis a outros patógenos e a exposição aos agrotóxicos (MACÍAS-MACÍAS et al., 2020; VIANA et al., 2021).

Além dos efeitos no sistema imunológico, é esperado que o intestino seja a rota mais provável de entrada no organismo, uma vez que as abelhas se alimentam de recursos florais, como pólen e néctar, que podem ser absorvidos no intestino junto com as moléculas de agrotóxicos (CRUZ-LADIM, 2009; BERRIDGE et al., 1969; OLIVEIRA et al., 2019; MIOTELO et al., 2020) e é o lugar onde pode aparecer a maior parte dos danos causados pelos agrotóxicos (BATISTA et al., 2020; BRITO et al., 2020; DOMINGUES et al., 2020). Por esse motivo, esse órgão é amplamente estudado em ensaio ecotoxicológicos com abelhas via oral (BATISTA et al., 2020; BRITO et al., 2020; DOMINGUES et al., 2020).

Dessa forma, é importante compreender se a exposição aos ingredientes ativos de classes diferentes pode afetar de forma isolada e combinada a morfofisiologia das abelhas sem ferrão e interferir no seu metabolismo suprimindo o seu sistema imunológico e digestório, deixando-as mais suscetíveis a doenças e a outros agrotóxicos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo principal: Avaliar os possíveis efeitos de concentrações residuais de campo encontradas no pólen e néctar das plantas do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, de forma isolada e combinada, sobre o desenvolvimento, o sistema imune e o sistema digestório das abelhas sem ferrão *S. postica*.

2.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver um método *in vivo* para validar os dados de laboratório existentes obtidos *in vitro*.
- Compreender os possíveis impactos dos agrotóxicos glifosato e imidacloprido de forma isolada e combinada sobre as abelhas sem ferrão *S. postica* expostas na fase larval por meio da análise dos seguintes parâmetros:
 - ✓ Taxas de mortalidade, pupação, defecação, desenvolvimento e emergência;
 - ✓ Morfometria da largura da cabeça e distância intertegular em abelhas recém-emergidas;
 - ✓ Número de células do sistema imune das abelhas nas fases larval e recém-emergida;
 - ✓ Histoarquitetura do intestino médio das abelhas recém-emergidas.

3. ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS

A dissertação está apresentada em dois capítulos. O primeiro capítulo apresenta os resultados da tentativa de desenvolvimento de um método *in vivo* para avaliação da toxicidade de agrotóxicos para *S. postica*. O segundo capítulo apresenta os resultados obtidos dos bioensaios *in vitro* de toxicidade com as larvas de abelhas expostas ao glifosato e imidacloprido de forma isolada e combinada, onde foram

avaliados parâmetros biológicos, como taxa de mortalidade, pupação, defecação e emergência. Também foram avaliados parâmetros morfométricos da largura da cabeça e distância intertegular em abelhas recém-emergidas, número de células do sistema imune das abelhas nas fases larval e recém-emergida e a histomorfologia do intestino médio de abelhas recém-emergidas.

4. REFERÊNCIAS

ABATI, R.; SAMPAIO, A.R.; MACIEL, R. M. A. et al. Bees and pesticides: the research impact and scientometrics relations. **Environ Sci Pollut Res**, [s. l.], v. 28, p. 32282–32298, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14224-7>.

AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários – 2022. Brasília. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acessado em: 09 nov. 2022.

AL NAGGAR, Y.; ESTRELLA-MALDONADO, H.; PAXTON, R. J.; SOLÍS, T.; QUEZADA-EUÁN, J. J. G. The Insecticide Imidacloprid Decreases *Nannotrigona* Stingless Bee Survival and Food Consumption and Modulates the Expression of Detoxification and Immune-Related Genes. **Insects**, [s. l.], v. 13, 972, 2022. <https://doi.org/10.3390/insects13110972>.

ALTHAUS, S. L.; BERENBAUM, M. R.; JORDAN, J.; SHALMON, D. A. No buzz for bees: Media coverage of pollinator decline. **Proc Natl Acad Sci**, [s. l.], v. 118, n. 2, e2002552117, 2021. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002552117>.

ALVARENGA, A. S.; SILVEIRA, F. A.; JÚNIOR, J. E. dos S.; NOVAIS, S. M. A.; QUESADA, M.; NEVES, F. S. Vegetation composition and structure determine wild bee communities in a tropical dry forest. **Journal of Insect Conservation**, [s. l.], v. 24, p. 487-498, 2020.

AMARAL, I. M. R.; NETO, J. F. MO.; PEREIRA, G. B.; FRANCO, M, B.; BELETTI, M. E.; KERR W. E.; BONETTI, A. M.; UEIRA-VIEIRA, C. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis, **Micron**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 123-129, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.10.003>.

Annoscia, D.; Di Prisco, G.; Becchimanzi, A. et al. Neonicotinoid Clothianidin reduces honey bee immune response and contributes to *Varroa* mite proliferation. **Nat Commun**, [s. l.], v. 11, p. 5887, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19715-8>.

ASSIS, C. de J., TADEI, R., MENEZES-OLIVEIRA, V. B., SILVA-ZACARIN, E. C. M. Are native bees in Brazil at risk from the exposure to the neonicotinoid imidacloprid? **Environ Res**, [s. l.], v. 212, p. 113127, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113127>.

BATISTA, E. C.; DOMINGUES, C. E. DA C.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? **Journal of Apicultural Research**, [s. l.], v. 59, n. 5, 2020.

BATTISTI, L.; POTRICH, M.; SAMPAIO, A. R.; GHISI, N. de C.; Costa-Maia, F. M.; Abati, R.; Martinez, C. B. dos R.; Sofia, S. H. Is glyphosate toxic to bees? A meta-analytical review, **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 767, 145397, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145397>.

BERNARDES, R. C.; BOTINA, L. L.; DA SILVA, F. P.; FERNANDES, K. M.; LIMA, M. A. P.; MARTINS, G. F. Toxicological assessment of agrochemicals on bees using machine learning tools. **J Hazard Mater**, v. 424, p. 127344, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127344>.

BERRIDGE, M. J.; OSCHMANN, J. L. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. **Tissue Cell**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 247-272, 1969.

BEZERRA, J. L. de S., NETO, R. de C. A.; LUNZ, A. M. P.; de ARAÚJO, J. M., de A. C. S. Produção de mudas de açazeiro (*Euterpe oleracea*) em resposta a diferentes fontes e doses de potássio. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.17 n.33; p. 360, 2020.

BIESMEIJER, J. C.; SLAA, E. J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 240 – 258, 2006.

BPBES/REBIPP (2019): Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. Marina Wolowski; Kayna Agostini; André Rodrigo Rech; Isabela Galarda Varassin; Márcia Maués; Leandro Freitas; Liedson Tavares Carneiro; Raquel de Oliveira Bueno; Hélder Consolaro; Luisa Carvalheiro; Antônio Mauro Saraiva; Cláudia Inês da Silva. Maíra C. G. Padgurschi (Org.). 1ª edição, São Carlos, SP: Editora Cubo. 184 páginas. <http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>.

BRITO, P., ELIAS, M., SILVA-NETO, C. et al. The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. **Environ Sci Pollut Res**, [s. l.], v. 27, p. 38654–38661, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08530-9>.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.L.; HOFFMANN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental & Comparative Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 4-5, p. 329-344, 1999.

CAMPBELL, A. J.; LICHTENBERG, E. M.; CARVALHEIRO, L. G.; MENEZES, C.; BORGES, R. C.; COELHO, B. W. T.; FREITAS, M. A. B.; GIANNINI, T. C.; LEÃO, K. L.; DE OLIVEIRA, F. F.; SILVA, T. S. F.; MAUÉS, M. M. High bee functional diversity buffers crop pollination services against Amazon deforestation, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 326, p. 107777, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107777>.

CHAM, K. de O.; REBELO, R. M.; OLIVEIRA, R. de P.; FERRO, A. A.; VIANA-SILVA, F. E. DE C.; BORGES, L. DE O.; SARETTO, C. O. S. D.; TONELLI, C. A. M.; MACEDO, T.C. Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília: **Ibama/Diqua**, 114 p, 2020.

CORBET, S. A.; WILLIAMS, I. H.; OSBORNE, J. L. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European community. **Bee World**, Buckinghamshire, v.72, n.2, p. 47-59, 1991.

CRUZ-LANDIM, C. da. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. 1 ed. São Paulo: Ed. UNESP; 2009.

DEL SARTO, M. C. L., PERUQUETTI, R. C., CAMPOS, L. A. O. Evaluation of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes, **J. Econ. Entomol.**, v. 98, p. 260–266, 2005.

DAI, P.; YAN, Z.; MA, S.; YANG, Y.; WANG, Q.; HOU, C.; WU, Y.; LIY, Y.; DAIO, Q. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 66, n. 29, p. 7786–7793, 2018.

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

DOS SANTOS, SOLANGE A.B., ANA C. ROSELINO AND LUCI R. BEGO. Pollination of Cucumber, *Cucumis sativus* L. (Cucurbitales: Cucurbitaceae), by the Stingless Bees *Scaptotrigona aff. depilis* Moure and *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini) in Greenhouses. **ECOLOGY, BEHAVIOR AND BIONOMICS**, Neotropical Entomology, v. 37, n. 5, p. 506-512, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2008000500002>.

DROSSART, M.; GÉRARD, M. Beyond the Decline of Wild Bees: Optimizing Conservation Measures and Bringing Together the Actors. **Insects**, [s. l.], v. 11, p. 649, 2020. <https://doi.org/10.3390/insects11090649>.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunology. **Ann. Rev. Entomol.** [s. l.], v. 31, p. 321- 339, 1986.

ELLIS, J. D.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 134-136, 2010.

FERNÁNDEZ, F. Sistemática dos Himenópteros sociais da Região Neotropical. *In*: Vilela EF, Santos IA, Shoereder JH, Serrão JE, Campos LA, Lino-Neto J, eds. **Insetos Sociais - da biologia à aplicação**, Viçosa: Editora UFV, p.174–195, 2008.

GOULSON, D., NICHOLLS, E., BOTÍAS, C., ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, [s. l.], v. 347, p. 1–16, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.

HAVARD, T.; LAURENT, M.; CHAUZAT, M.-P. Impact of Stressors on Honey Bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae): Some Guidance for Research Emerge from a Meta-Analysis. **Diversity**, v. 12, n. 1, p. 7, 2020. <https://doi.org/10.3390/d12010007>.

IBAMA – Boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos – 2020. Brasília: **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos naturais**. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 09 nov. 2022.

JAFFÉ, R., POPE, N., CARVALHO, A.T., MAIA, U.M., BLOCHTEIN, B., DE CARVALHO, C.A.L., CARVALHO-ZILSE, G.A., FREITAS, B.M., MENEZES, C., DE FÁTIMA RIBEIRO, M., VENTURIERI, G.C. & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **PLoS One**, [s. l.], n. 10, p. e0121157, 2015.

KASIOTIS, K. M.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; ANASTASIADOU, P.; MACHERA, K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. **Science of The Total Environment**, [s. l.], v. 485-486, p. 633-642, 2014.

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

LEÃO, K.L., QUEIROZ, A.C.M., VEIGA, J.C., CONTRERA, F.A.L., & VENTURIERI, G.C. Colony Development and Management of the Stingless Bee *Scaptotrigona aff. postica* (Apidae: Meliponini) Using Different Hive Models. **Sociobiology**, v. 63, p. 1038–1045, 2016.

LI, Z.; YU, T., CHEN, Y.; HEERMAN, M.; HE, J.; HUANG, J.; NIE, H.; SU, S. Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 156, p; 36-43, 2019.

MACÍAS-MACÍAS, J.O., TAPIA-RIVERA, J.C., DE LA MORA, A. et al. *Nosema ceranae* causes cellular immunosuppression and interacts with thiamethoxam to increase mortality in the stingless bee *Melipona colimana*. **Sci Rep**, [s. l.], v. 10, p. 17021, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74209-3>.

MALAGODI-BRAGA, K. S. A polinização como fator de produção na cultura do morango. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p.13, 2018.

MARZINZIG, B.; BRÜNJES, L.; BIAGIONIC, S.; BEHLING, H.; LINK, W.; WESTPHAL, C. Bee pollinators of faba bean (*Vicia faba* L.) differ in their foraging behaviour and pollination efficiency. **AGRICULTURE, ECOSYSTEMS & ENVIRONMENT**, [s. l.], v. 264, p. 24-33, 2018.

MICHENER, C. D. The bees of the world, 2nd edn. **The Johns Hopkins University Press**, Baltimore, 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.

MIOTELO, L., DOS REIS, A. L. M., ROSA-FONTANA; A., PACHÚ, J. K. DA S.; MALAQUIAS, J. B.; MALASPINA, O., ROAT, T. C. A food-ingested sublethal concentration of thiamethoxam has harmful effects on the stingless bee *Melipona scutellaris*. **Chemosphere**, v. 288, p. 132461, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132461>.

MOTTA, E. V. S., MAK, M., DE JONG, T. K., POWELL, J. E., O'DONNELL, A., SUHR, K. J., RIDDINGTON, I. M., MORAN, N. A. Oral or Topical Exposure to Glyphosate in Herbicide Formulation Impacts the Gut Microbiota and Survival Rates of Honey Bees. **Appl Environ Microbiol.**, v. 86, n. 18, p.e01150-20, 2020 <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>.

MUTO, N. A.; LEITE, R. O. de S.; PEREIRA, D. S.; ROGEZ, H. L. G.; VENTURIERI, G. C. Impact of the introduction of stingless bee colonies (*Scaptotrigona aff. postica*) on the productivity of acai (*Euterpe oleracea*), **Revista Verde**, Pombal, v. 15, n.3, p. 265-273, 2020. <https://doi.org/10.18378/rvads.v15i3.8404>.

NOGUEIRA-NETO, P. **A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 1. ed. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

ODANAKA, K. A.; REHAN, S. M. Impact indicators: Effects of land use management on functional trait and phylogenetic diversity of wild bees. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 286, p. 106663, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106663>.

OLIVEIRA, A. H., GONÇALVES, W. G., FERNANDES, K. M., BARCELLOS, M. S., SAMPAIO, W. M. S., LOPES, M. P., MARTINS, G. F., SERRÃO, J. E. Morphology and Morphometry of the Midgut in the Stingless Bee *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). **Insects**, v. 10, n. 3, p. 73, 2019. <https://doi.org/10.3390/insects10030073>.

OLIVEIRA, R. C. de; QUEIROZ, S. C. do N.; LUZ, C. F. P. da; PORTO, R. S.; RATH, S. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. **Chemosphere**, [s. l.], v. 163, p. 525-534, 2016.

PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology: An international journal on social insects**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PETTER, F. A, SEGATE, D., PACHECO, L. P., ALMEIDA, F. A., ALCÂNTARA NETO, F. Incompatibilidade física de misturas entre herbicidas e inseticidas. **Planta Daninha**, v. 30, p. 449-457, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582012000200025>.

PINHEIRO, M.; GAGLIANONE, M. C., NUNES, C. E. P.; SIGRIST, M. R.; SANTOS, I. A DOS. **Biologia da polinização**. In: Polinização por abelhas. (org.). Rio de Janeiro, Projeto Cultural, 2014, p. 205-2034.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. de M.; LOPES, M. T. do R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, É. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

PPDB, Pesticides Properties Database, 2022. A to Z List of Pesticide Active Ingredients. URL: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>. Accessed at November 09, 2022.

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

RAVAIANO, S. V., BARBOSA, W. F., TOMÉ, H. V. V., CAMPOS, L. A. DE O., MARTINS, G. F. Acute and oral exposure to imidacloprid does not affect the number of circulating hemocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* post immune challenge, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 152, p. 24-28, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.08.002>.

ROSA-FONTANA, A.; DORIGO, A. S.; GALASCHI-TEIXEIRA, J. S.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase? **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 265, part B, p. 1-9, 2020.

SANTOS, A. C.C.; CRISTALDO, P. F.; ARAÚJO, A. P. A.; MELO, C. R.; LIMA, A. P. S.; SANTANA, E. D. R.; OLIVEIRA, B. M. S. de; OLIVEIRA, J. W. S.; VIEIRA, J. S.; BLANK, A. F.; BACCI, L. *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera) in the target of neonicotinoids: A one-way ticket? Bioinsecticides can be an alternative. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 163, p. 28-36, 2018.

SGOLASTRA, F.; MEDRZYCKI, P., BORTOLOTTI, L.; MAINI, S.; PORRINI, C.; SIMON-DELISO, N.; BOSCH, J. Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. **Biol. Conserv.**, v. 241, p. 108356, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108356>.

SILVA, C. M. de S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos & Ambiente**.1. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

SILVA, C.I., Aleixo, K.; Nunes-Silva, Freita, B. M. Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras do Brasil. 1ª Edição. **USP**, São Paulo – SP. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 2017.

TOMÉ, H. V. V.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A. P.; CAMPOS, L. A. O.; GUEDES, R. N. C. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 6, 2012.

TOMIZAWA, M.; LEE, D. L.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 45, p. 247–268, 2005.

VÁZQUEZ, D. E., ILINA, N., PAGANO, E. A., ZAVALA, J. A., FARINA, W. M. Glyphosate affects the larval development of honey bees depending on the susceptibility of colonies. **PLoS One**, v. 13, n. 10 p. e0205074, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205074>.

VEGA-HIDALGO, Á., AÑINO, Y., KRICHILSKY, E. et al. Decline of native bees (Apidae: *Euglossa*) in a tropical forest of Panama. **Apidologie**, v. 51, p. 1038–1050, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00781-2>.

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, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00814-w>.

WILLIAMS, C.S. Conserving Europe's bees: why all the buzz? **Trends in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 309–310, 1995.

YAMADA, T.; CAMARGO, P.R. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agrônômicas. **Informações Agrônômicas**, Piracicaba, n. 119, p. 1-17, 2007.

ZATTARA, E. E.; AIZEN, M. A.. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness, **One Earth**, v. 4, p. 114-123, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>.

ZERBO, A. C. Diferenciação morfológica e funcional do tubo digestivo de operárias de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 101p. 2003.

5. CAPITULO 1 – Desenvolvimento de um método para bioensaios toxicológicos *in vivo* para larvas de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica*

5.1. INTRODUÇÃO

A avaliação de risco de agrotóxicos no Brasil para insetos polinizadores é realizada com a abelha *A. mellifera*, seguindo protocolos internacionais da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) ou da Agência de Proteção Ambiental (EPA). É composta por testes de toxicidade oral e de contato em abelhas adultas (protocolos OECD 213 e 214) que visam determinar a dose letal média que mata 50% da população de abelhas (DL₅₀); por testes de toxicidade crônica em abelhas adultas e larvas (protocolos OECD 237 e 245) que são utilizados quando apresentar uma DL₅₀ < 11 µg de ingrediente ativo por abelha e por último teste de campo e semi-campo que detectam o impacto nas larvas, no desenvolvimento, na habilidade de forrageamento, entre outros (CHAM et al., 2020). No entanto, esta espécie de abelha não é nativa do Brasil, sendo diferente das abelhas sem ferrão nativas pela sua biologia e pela sua sensibilidade aos agrotóxicos (BRIGANTE et al., 2021; CHAM et al., 2019; DEL SARTO et al., 2014; DORNELES et al., 2017; DORIGO et al., 2019; LOURENÇO et al., 2012).

Assim, a maior parte das abelhas sem ferrão, diferente da *A. mellifera*, nidificam em cavidades pré-existentes em troncos ou galhos de árvores com entradas características para cada espécie (MICHENER, 2013; NOGUEIRA-NETO, 1997). Os ninhos são construídos de cerume, uma mistura de cera produzida pelas abelhas com resina e outras substâncias vegetais pegajosas (MASSARO et al. 2011). A adição de resina proporciona vantagens, tais como firmeza no material para construção do ninho e propriedades antimicrobianas, reduzindo o crescimento dos microrganismos (MASSARO et al., 2011; TORRES et al., 2018).

As células de cria são feitas com cerume e construídas para o desenvolvimento de abelhas de forma individual. Existem três tipos de arranjo celulares: discos horizontais, discos verticais e discos com células agrupadas, mas a maioria das espécies de abelhas sem ferrão constroem os discos horizontais (WILLE 1983). Cada

disco consiste em uma única camada de células que se abrem para cima. Pilares finos de cerume sólido mantêm os discos horizontais no lugar (MICHENER, 2013). A alimentação é fornecida em um processo conhecido por provisionamento em massa, ou seja, antes que a rainha deposite um ovo, várias operárias regurgitam o alimento na célula de cria até cerca de 2/3 do seu volume total. Depois da oviposição, a célula é fechada rapidamente e permanece selada até que a abelha esteja pronta para emergir. Após a emergência, as abelhas adultas retiram todas as células de cria e as descartam (NOGUEIRA-NETO, 1997). Esse processo difere consideravelmente da criação das *A. mellifera* onde a rainha põe os ovos em células vazias reutilizáveis e o alimento é disponibilizado progressivamente por vários dias antes que as células sejam seladas (GRÜTER et al., 2020).

As abelhas sem ferrão estabeleceram relações fundamentais com os microrganismos, principalmente com os fungos, ainda pouco compreendido (MENEZES et al., 2015). Os fungos encontrados no alimento larval podem estar auxiliando na conservação do alimento, uma vez que as larvas permanecem com o alimento por um período maior que as *A. mellifera* (VIT et al., 2013). Outra simbiose observada é com o fungo *Zygosaccharomyces*, onde as larvas de abelhas do gênero *Scaptotrigona* desenvolveram uma dependência para a sua sobrevivência. O fungo cresce dentro das células de cria e as larvas se alimentam deles para poder realizar a metamorfose, o fungo parece fornecer precursores esteroidais essenciais para a pupação (MENEZES et al., 2015; PALUDO et al., 2018).

É notório as diferenças entre as espécies de abelhas, nativas e *A. mellifera*, por isso, o presente trabalho visou desenvolver um método para avaliar os efeitos tóxicos de agrotóxicos para abelhas nativas sem ferrão, *in vivo*, com o propósito de contribuir com métodos mais adequados para a conservação de polinizadores nativos.

5.2. OBJETIVO

- Desenvolver um método *in vivo* para validar os dados de laboratório existentes obtidos *in vitro*.

5.3. MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1. Meliponário e coleta das abelhas

Os bioensaios foram realizados com colônias da espécie *S. postica* em condições ideais de saúde, livres de doenças ou parasitas, que foram monitoradas previamente semanalmente e nenhum tratamento foi aplicado antes da utilização nos bioensaios. Os meliponários utilizados estão localizados no Centro de Estudos de Insetos Sociais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Rio Claro (22°23' 48.851" S; 47° 32'38.234" W) e do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Araras (22°21'25" S, 47°23'03" W), Figura 2. A realização dos bioensaios ocorreu no período da manhã com temperatura superior a 25°C.

A proposta deste método é inédita e até o presente momento não encontramos trabalhos com toxicidade crônica oral onde a exposição aos agrotóxicos ocorresse dentro da própria colônia de abelhas sem ferrão. Por isso, realizamos vários bioensaios para tentar encontrar um método adequado e posteriormente introduzir os agrotóxicos no alimento larval. Os bioensaios foram baseados na biologia da abelha *S. postica*, onde é possível observar na Figura 1, que as células de cria permanecem seladas durante o desenvolvimento da larva até sua emergência.

Foram realizados três bioensaios, no primeiro bioensaio: dentro da colônia, as células de cria foram desoperculadas e selada com diferentes materiais (item 5.3.2); no segundo bioensaio: dentro da colônia, sem desopercular as células de cria, foi aplicado o alimento larval com diferentes tamanhos de agulhas (item 5.3.3), *in vivo*; terceiro bioensaio, sem desopercular as células de cria, foi aplicado o alimento larval com diferentes tamanhos de agulhas, *in vitro* (com temperatura controlada - item 5.3.4).

No primeiro bioensaio foi utilizado quatro colônias (uma para coleta do cerume e três para introdução dos materiais), no segundo bioensaio foi utilizado duas colônias (uma para coleta do alimento larval e outra para realizar o bioensaio) e no terceiro bioensaio foi utilizado três colônias (duas para os bioensaios e uma para coleta do alimento). Todos os bioensaios foram avaliados após 7 dias e 14 dias (quando possível), esse período foi estipulado para evitar mais perturbação para colônia após a realização dos bioensaios.

Figura 2 – Meliponários utilizados para realização dos bioensaios. (a) Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), campus Rio Claro (b) Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus em Rio Claro (Autoria própria).

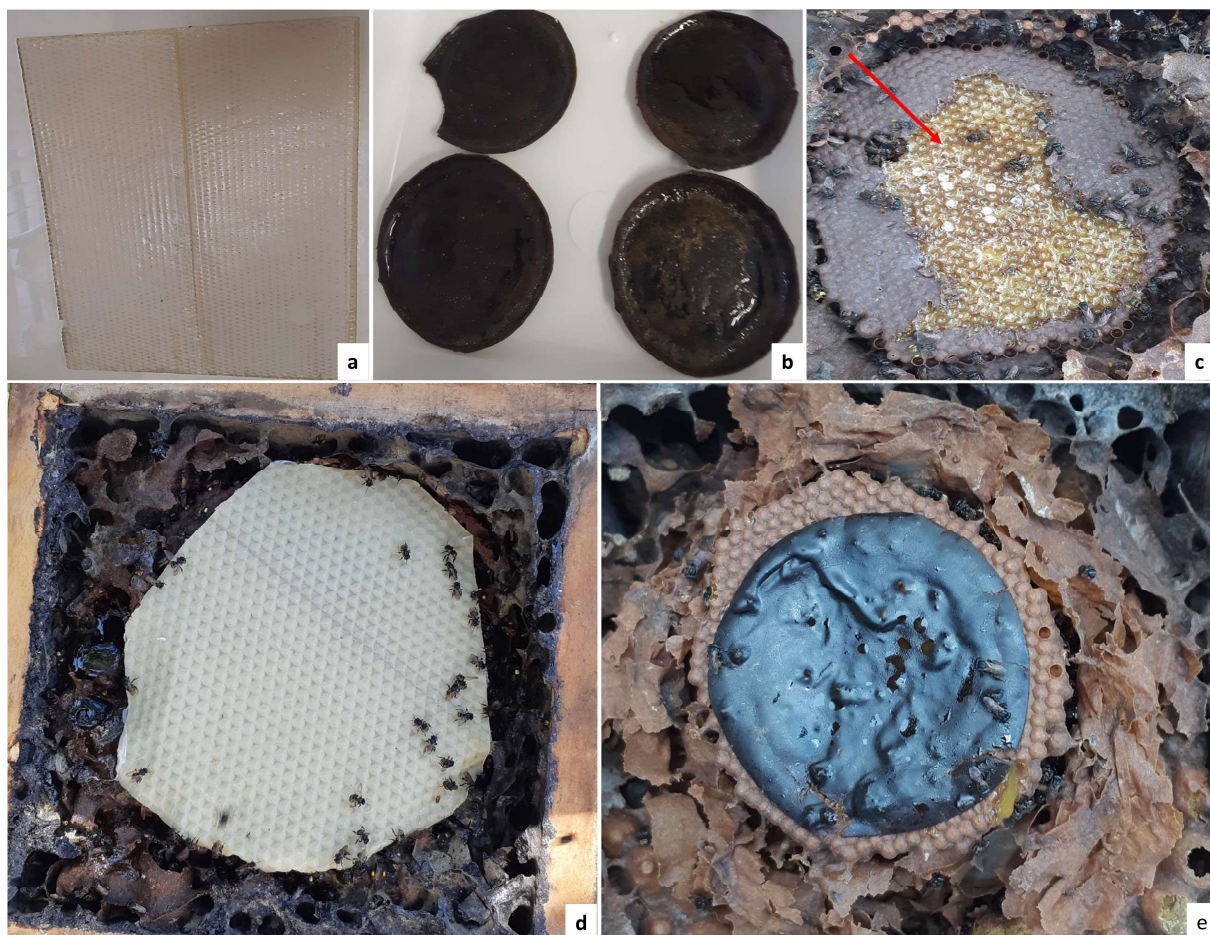


5.3.2. Bioensaio 1 (Desoperculação e desenvolvimento das larvas)

No primeiro bioensaio, abrimos a caixa das colônias com cuidado para evitar qualquer dano na sua estrutura, identificamos as células de cria com larvas de primeiro e segundo instar (identificação possível através coloração mais clara das células de cria – bege claro), desoperculamos as células de cria e utilizamos os materiais citados abaixo (M1, M2 e M3) para cobrir o disco e fechar as células desoperculadas e permitir o desenvolvimento da larva. Após procedimento, a caixa foi fechada com os materiais dentro e permaneceu por 15 dias. Cada tipo de material foi colocado em uma colônia diferente. As avaliações foram realizadas após 7.

- M1 – placa de cera (produzida pela espécie *A. mellifera*) foi aquecida com o auxílio de secador de cabelo, para torná-la mais flexível e fixá-la no parafilm (Laboratory Film, roll size 4 in. X 125 ft.). Essa placa foi cortada e moldada no formato do disco de cria (Figura 3(a)). Escolhemos esse material por ser fácil de manusear e disponível no mercado.
- M2 – o cerume (produzido pela espécie *S. postica*) foi retirado da colônia, aquecido em banho-maria até ficar líquido. Para delinear a placa no formato do disco de cria, verteu-se o cerume líquido em uma placa de Petri de vidro e cortou-se até se encaixar nos discos de cria (Figura 3(b)). Escolhemos esse material por ser da própria espécie e acreditávamos que fossem de melhor aceitação pelas abelhas.
- M3 – não foi introduzido nenhum material (controle), apenas abrimos a colônia, identificamos as células de cria de primeiro e segundo instar e fechamos.

Figura 3 – Fotos do 1º bioensaio *in vivo* com *Scaptotrigona postica*. Foi realizado dentro da caixa da colônia com diferentes materiais para o fechamento das células de cria. (a) placa de cera + parafilm (M1); (b) placa de cerume (M2); (c) disco de cria com as larvas de 1º instar e alimento, a seta indica as células de cria desoperculadas (d) disco de cria com a placa de cera (M1); (e) disco de cria com a placa de cerume (M2). (Autoria própria).



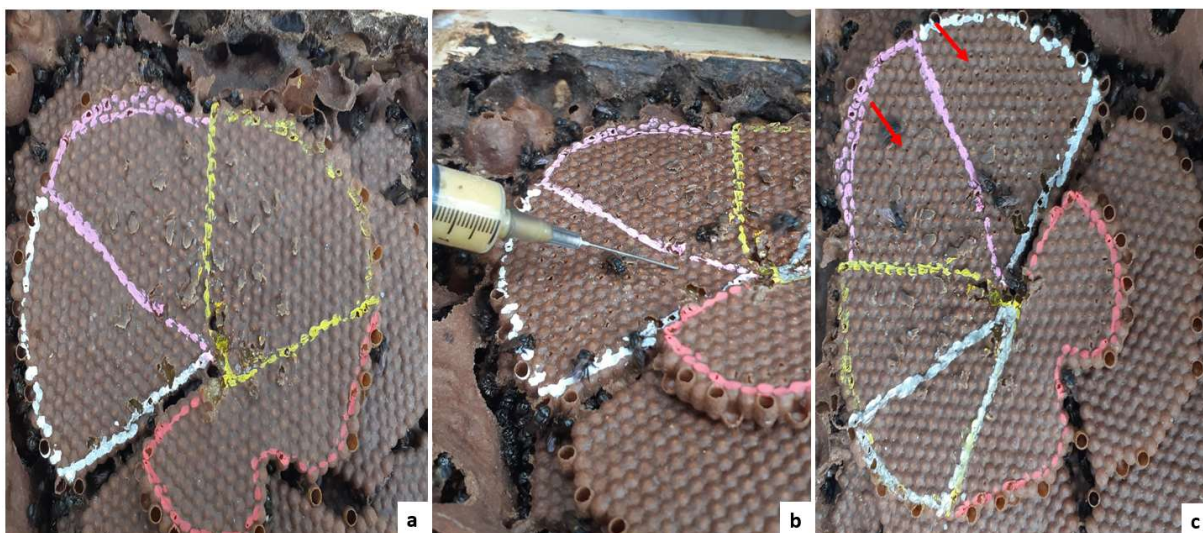
5.3.3. Bioensaio 2 (Introdução do alimento larval *in vivo*)

No segundo bioensaio, abrimos uma colônia, identificamos o disco com as células de cria com larvas de primeiro e segundo instar, sem tirar do lugar o disco de cria, dividimos o disco em cinco quadrantes (com mais de 60 células cada) que foram marcados com canetas não tóxicas para as abelhas. Com as células operculadas, aplicamos na lateral das células (para não atingir a larva) o alimento larval da própria *S. postica* (coletado de outra colônia) com diferentes tipos de agulhas, conforme especificação abaixo (S1, S2, S3, S4 e S5). Após o procedimento, a caixa da colônia

foi fechada e avaliada depois de 7 (Figura 4). Quadrante S1 - agulha de insulina (8 x 0,3 mm).

- Quadrante S2 - agulha cinza (30 x 7 mm).
- Quadrante S3 - microseringa de Hamilton (Hamilton 80900 1705N Syringe) com agulha fixa (1705N, volume 50 μ L, needle size 22s ga (bevel tip), needle L 51 mm (2 in.)).
- Quadrante S4 – agulha de insulina (8 x 0,3 mm), sem injetar o alimento larval (controle).
- Quadrante S5 - não foi feito nenhum procedimento (branco).

Figura 4 – Fotos do 2º bioensaio *in vivo* com *Scaptotrigona postica*. Foi realizado dentro da caixa da colônia e as células de cria foram furadas com agulha de diferentes tamanhos para inserir o alimento larval; (a) disco de cria marcado para diferenciar os tipos de agulhas e controles, (b) demonstração da aplicação do alimento larval na célula de cria com a agulha tamanho (30 x 7 mm); (c) discos de cria onde é possível observar que após as aplicações ficam pequenas aberturas nas células de cria (Autoria própria).



O alimento larval foi escolhido para aplicação nas células de cria porque nosso objetivo era, posteriormente, aplicar o agrotóxico diretamente no alimento larval. Uma vez que o alimento larval diluído em água forma uma pasta mudando assim as propriedades do mesmo (teste realizado por Dorigo, não publicado).

5.3.4. Bioensaio 3 (Introdução do alimento larval *in vitro*)

No terceiro bioensaio, foi realizado o mesmo procedimento com as agulhas do segundo bioensaio (item 5.3.3), mas agora dentro do laboratório. Abrimos três caixas de colônias (duas para os bioensaios e uma para coleta do alimento), identificamos os discos com as células de cria com larvas de primeiro e segundo instar, coletamos os discos de cria, pela técnica desenvolvida por Dorigo et al. (2019) e levamos os discos acondicionados em caixas de plástico tamanho 10,3 cm x 21,8 cm x 33 cm (para evitar choque térmico e ressecamento) para o laboratório.

No laboratório, a sala foi previamente preparada para manter a umidade relativa do ar acima de 75% e a temperatura acima de 25°C, para isso, utilizamos umidificador de ar (Mondial, Modelo UA-05) e aquecedor (Mondial, Modelo A-08). Selecionamos dois discos de cria e colocamos cada um em placas de Petri de vidro com tampa (1,25 x 20 cm), dividimos esses discos em quadrantes que foram marcados com canetas não tóxicas para as abelhas.

Na placa 1, o disco de cria foi dividido em três quadrantes (com mais de 80 células cada). Com as células operculadas, aplicamos na lateral da célula de cria o alimento larval da própria *S. postica* (coletado de outra colônia) com diferentes tipos de agulhas, conforme especificação abaixo (Q1, Q2, Q3). Após o procedimento, a placa de Petri com o disco de cria fechada foi colocada em incubadora BOD (demanda bioquímica de oxigênio) com temperatura de 30°C e umidade relativa do ar de 95%. A avaliação ocorreu após 7 e 14 dias (Figura 5(a)).

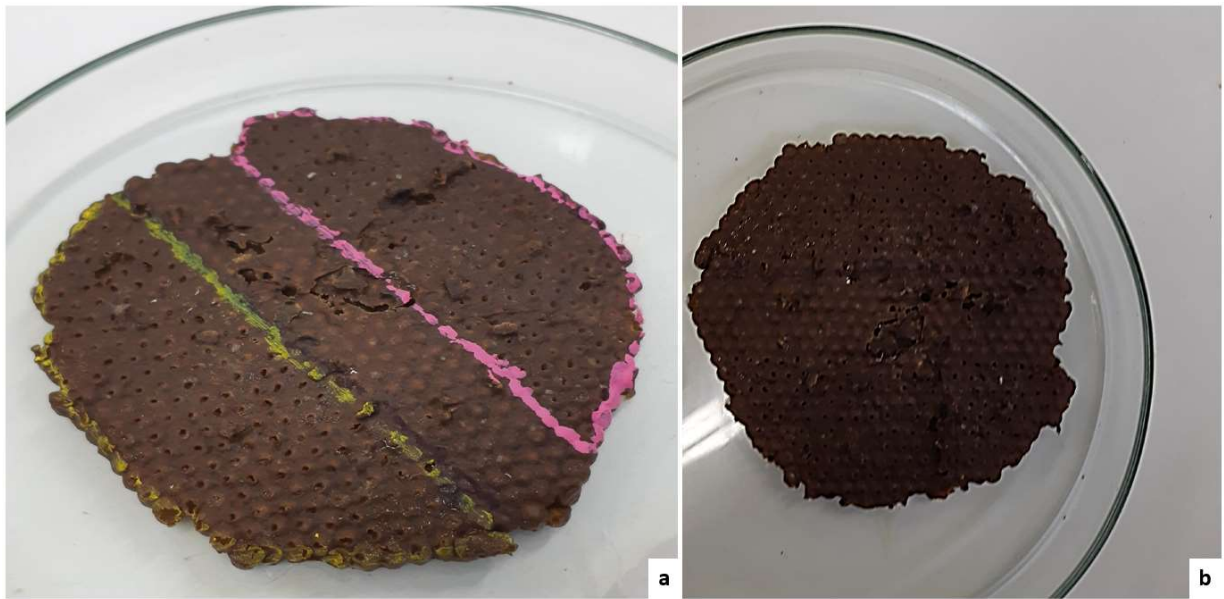
- Quadrante Q1 - microseringa de Hamilton (Hamilton 80900 1705N Syringe) com agulha fixa (1705N, volume 50 µL, needle size 22s ga (bevel tip), needle L 51 mm (2 in.)).
- Quadrante Q2 - agulha de insulina (8 x 0,3 mm).
- Quadrante Q3 - agulha cinza (30 x 7 mm).

Na placa 2, o disco de cria foi dividido em dois quadrantes (com mais de 80 células cada) e foi realizado o mesmo procedimento da placa 1, conforme descrito abaixo, e foi avaliado após 7 e 14 dias (Figura 5(b)).

- Quadrante Q4 - agulha de insulina (8 x 0,3 mm) sem injetar o alimento larval (controle).

- Quadrante Q5 - não houve qualquer manipulação (branco).

Figura 5 – Fotos do 3º bioensaio *in vivo* com *Scaptotrigona postica*. Foi realizado retirando discos de cria da colônia e as células perfuradas com agulhas de diferentes tamanhos para inserir o alimento larval e aclimatados em incubadoras; (a) disco de cria dividido em quadrantes que foram marcados com canetas não tóxica para as abelhas diferenciando os tipos de agulhas utilizados; (b) disco de cria dos controles. (Autoria própria).



5.4. RESULTADOS

5.4.1. Bioensaio 1 (Desoperculação e desenvolvimento das larvas)

No primeiro bioensaio, em que testamos diferentes materiais (M1 – placa de cera + parafilm e M2 – placa de cerume) para selar as células de cria, observamos após 7 dias que grande parte do material M1 havia sido retirado da colônia pelas abelhas (Figura 6) e toda área onde estava as células de cria desoperculadas (alimento e larva) foram completamente removidas. O material M2, a placa de cerume quase não foi removida pelas abelhas, mas todas as células que estavam desoperculadas foram retiradas junto com o alimento larval e as larvas (Figura 7). Os materiais M1 e M2 foram completamente removidos pelas abelhas após 14 dias. No controle não foi observado qualquer alteração nos discos de cria e após 7 e 14 dias.

Figura 6 – Fotos do resultado do primeiro bioensaio *in vivo* (parte 1). As células de cria de *Scaptotrigona postica* foram vedadas com o material M1 (placa de cera + parafilm) e avaliadas depois de sete dias; (a) parte inferior da colônia onde estava o material M1; (b) parte de cima da colônia e partes do material que as abelhas ainda não tinham removido, indicado na seta; (c) detalhe da colônia onde as abelhas retiraram as células de cria desoperculadas; nota-se que elas retiraram as células desoperculadas deixando apenas as células que não foram mexidas (Autoria própria).

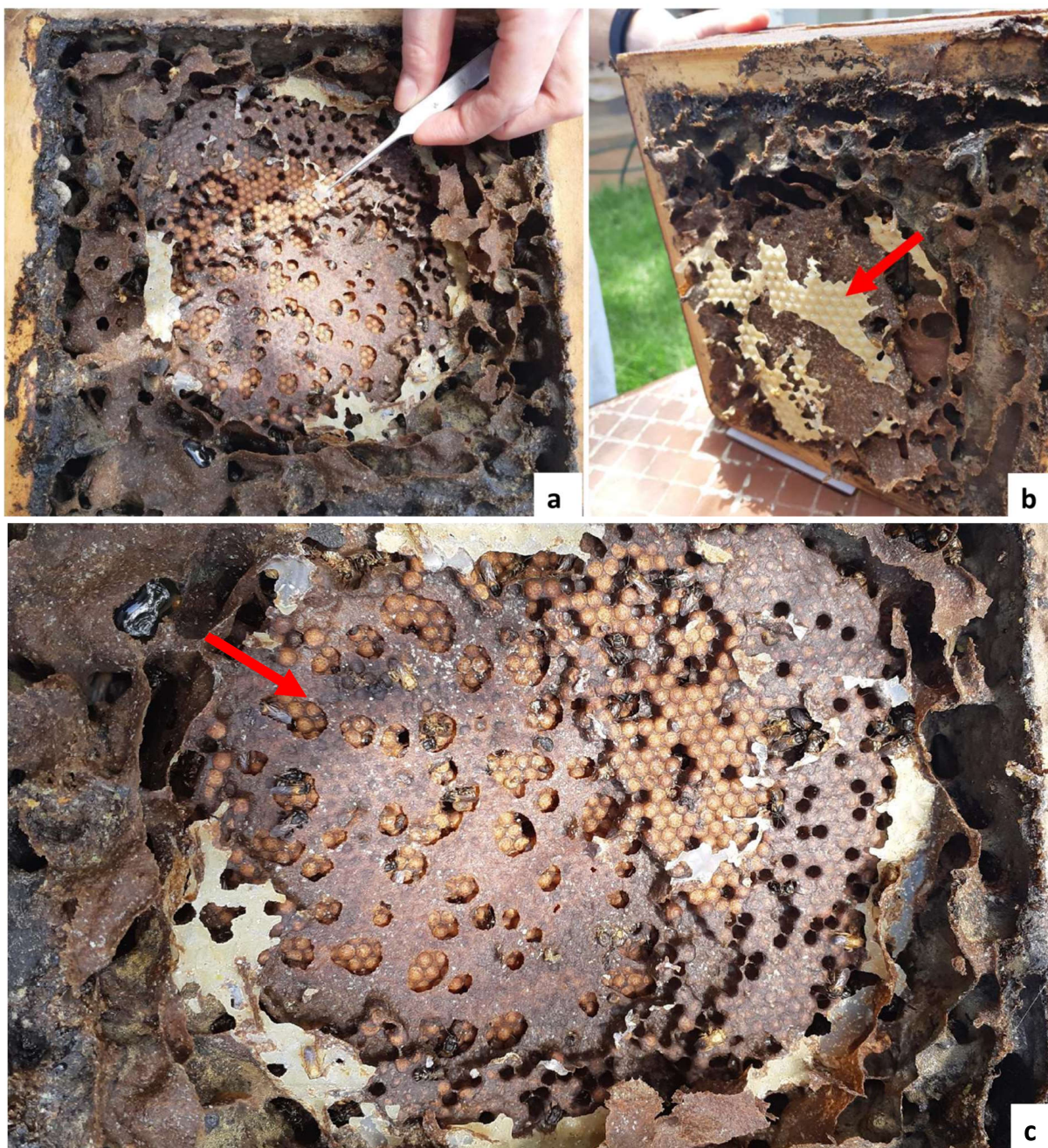
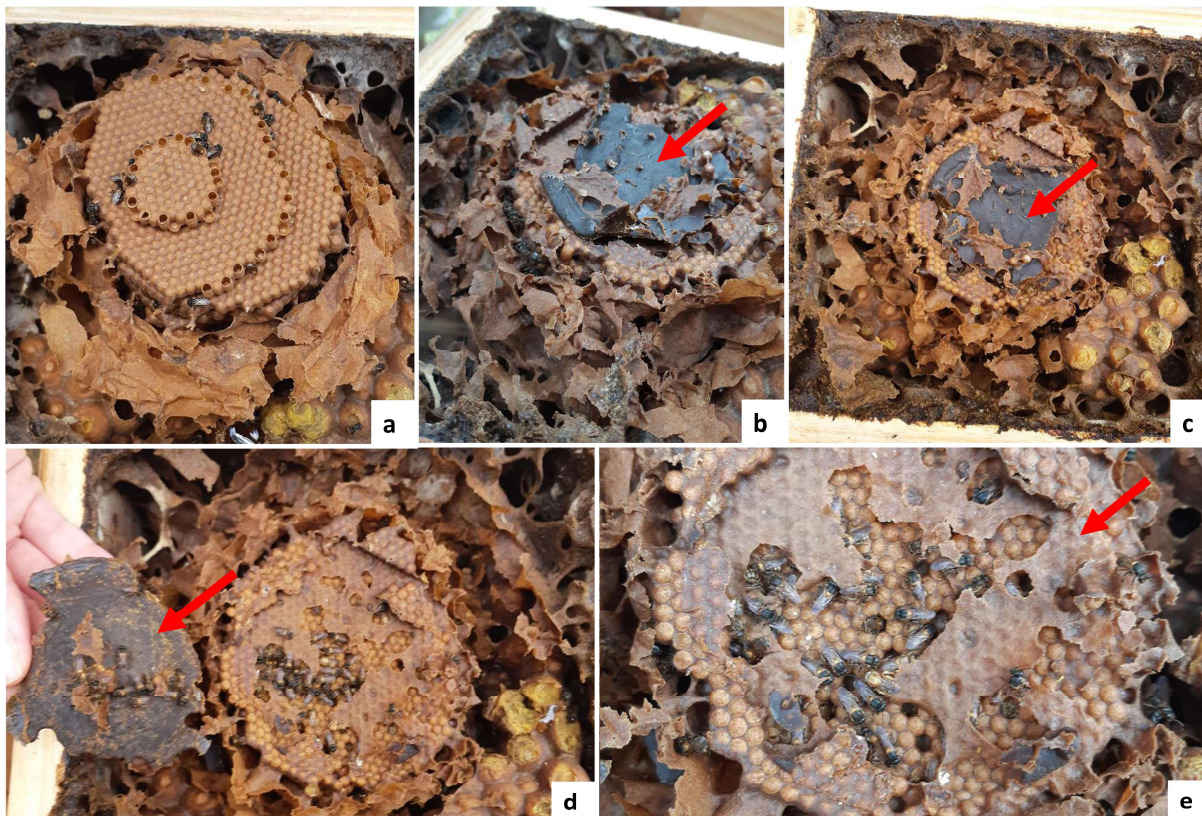


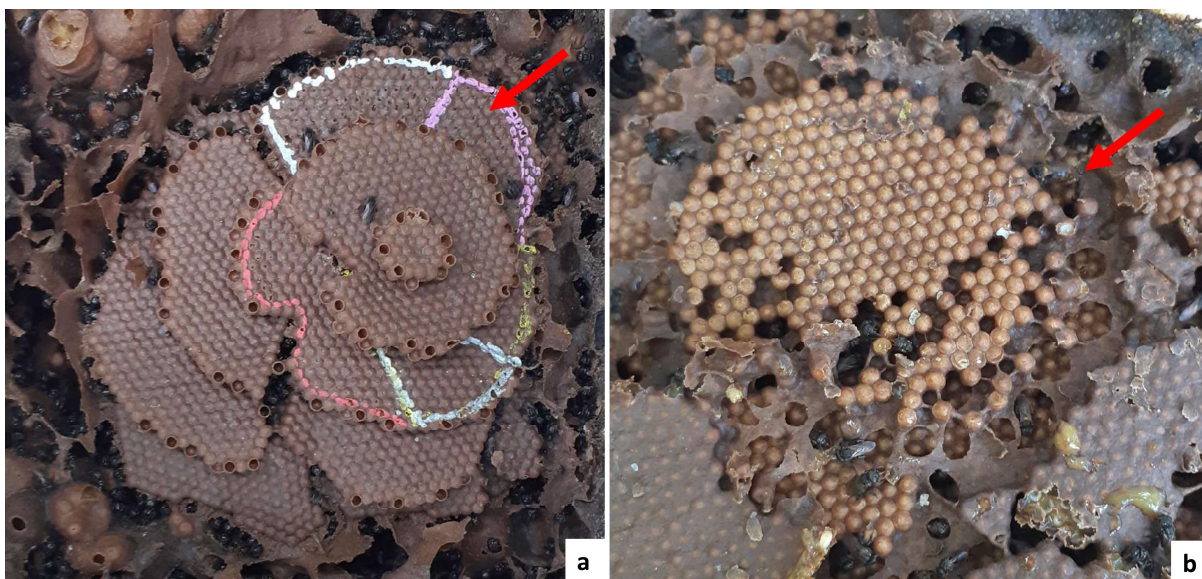
Figura 7 – Fotos do resultado do primeiro bioensaio *in vivo* (parte 2). As células de cria desoperculadas de *Scaptotrigona postica* foram vedadas o com o material M2 (placa de cerume) e do controle depois de sete dias; (a) controle; (b) e (c) colônia após a abertura, onde é possível observar a placa de cerume, (d) a seta mostra alteração na placa de cerume; (e) remoção das células de cria desoperculadas (Autoria própria).



5.4.2. Bioensaio 2 (Introdução do alimento larval *in vivo*)

No segundo bioensaio, com as agulhas de diferentes tamanhos (S1 e S2) e a microseringa de Hamilton (S3), foi observado na avaliação do sétimo dia que as abelhas retiraram todas as células de cria do disco, inclusive as larvas e o alimento. O mesmo comportamento foi observado no quadrante onde as células de cria foram apenas furadas e no quadrante onde não houve nenhum tipo de manipulação, como demonstrado na Figura 8. Encerramos as observações após o sétimo dia pois não havia mais as células as quais manipulamos.

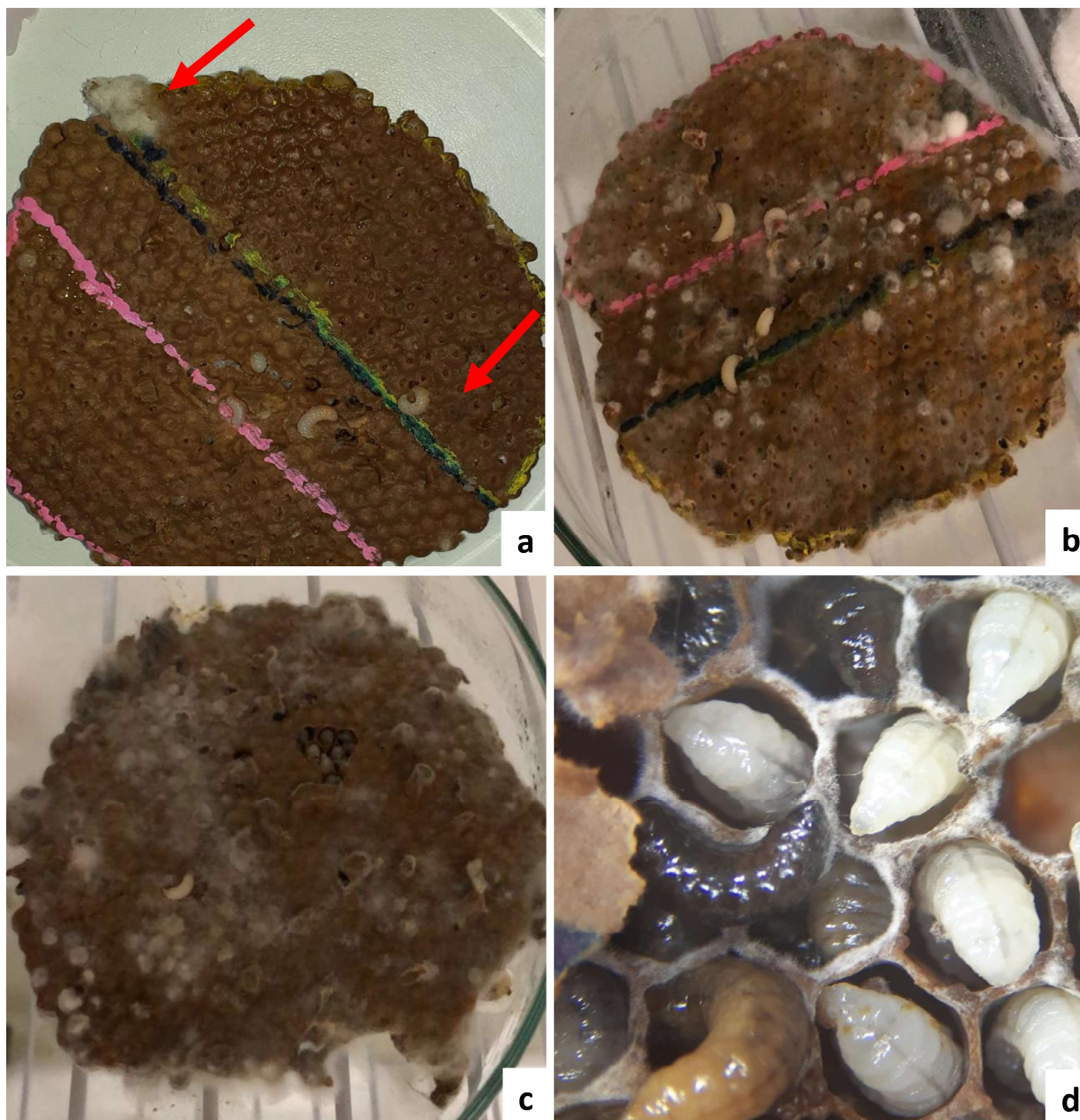
Figura 8 – Fotos do resultado do segundo bioensaio *in vivo*. Os discos de cria de *Scaptotrigona postica* foram perfurados com diferentes tamanhos de agulhas e os discos permaneceram na colônia por sete dias; (a) discos de cria no primeiro dia (o disco foi marcado para facilitar a visualização); (b) discos de cria no sétimo dia, nota-se um espaço vazio onde estavam as células perfuradas, pois as abelhas adultas retiraram as células, o alimento e as lavas (Autoria própria).



5.4.3. Bioensaio 3 (Introdução do alimento larval *in vitro*)

No terceiro experimento, onde os discos de cria foram aclimatados em incubadora, após 7 dias foi observado a formação de algumas colônias de fungos nos discos de cria das placas 1 e 2, e a maior parte das larvas estavam vivas, porém algumas larvas saíram das suas células. Depois de 15 dias, foi observado a mortalidade $\geq 70\%$ das larvas da placa 1 e a proliferação de fungos, podendo ser observado em todo o disco de cria, o que pode ter impossibilitando a sobrevivência e desenvolvimento das larvas. Essa mortalidade das larvas e proliferação dos fungos também foi observada no controle (placa 2), como apresentado na Figura 9.

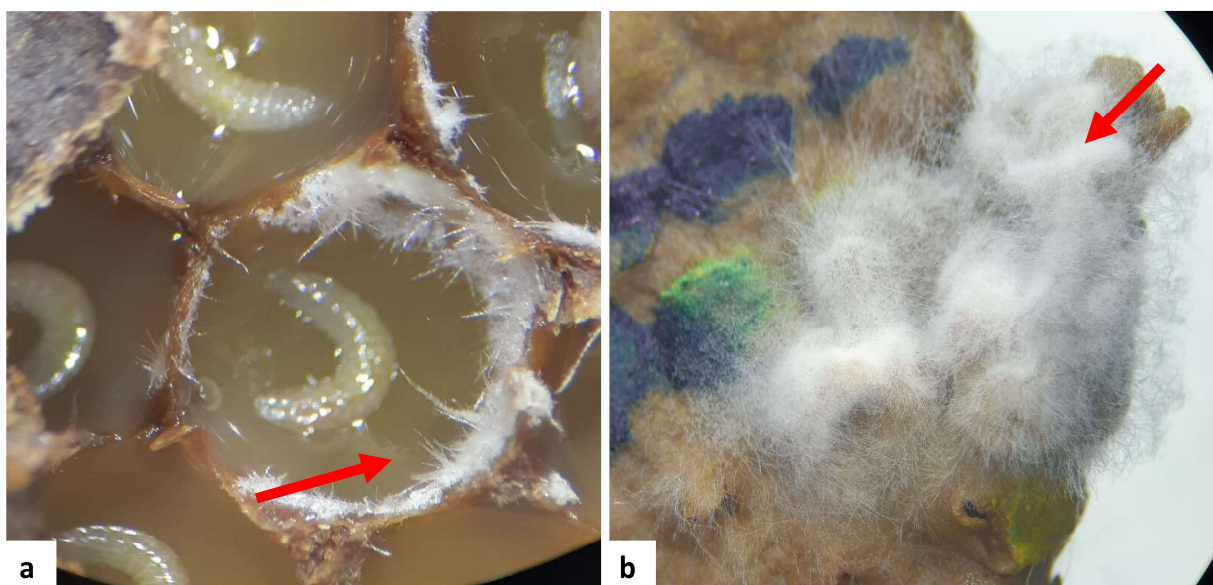
Figura 9 – Fotos do resultado do terceiro bioensaio *in vivo*. Os discos de cria de *Scaptotrigona postica* foram retirados da colônia, perfurados com diferentes tamanhos de agulhas e aclimatados em incubadora; (a) foto do disco de cria após sete dias, nas setas é possível observar o crescimento do fungo e também algumas larvas que saíram das células de cria; (b) e (c) discos de cria após 14 dias, observa-se a proliferação dos fungos por todo o disco; (d) observa-se larvas vivas (claras) e outras mortas (mais escuras; Autoria própria).



Na Figura 10(a) é possível observar nas bordas das células de cria a presença natural e controlada do fungo no disco que foi retirado da colônia de *S. postica* e na Figura 10(b) a proliferação do fungo no disco de cria aclimatado em incubadora, após 7 dias. Observamos que o fungo encontrado no final do bioensaio possuía características morfológicas (fenotípicas) semelhantes ao do fungo encontrado naturalmente nas colônias das abelhas, tais como colônia filamentososa, de textura algodoadosa (micélio aéreo alto e denso), de coloração branca, com bordas irregulares.

Nenhuma colônia foi perdida após a realização de todos os bioensaios (1, 2 e 3), houve uma perturbação (estresse) durante o período de teste e após dois meses elas se restabeleceram.

Figura 10 – Fotos da morfologia do fungo da *Scaptotrigona postica*. (a) fungo na borda da célula de cria no disco retirado da colônia; (b) fungo proliferado no disco de cria aclimatado na incubadora (Autoria própria).



5.5. DISCUSSÃO

O maior desafio para a realização dos bioensaios foi encontrar um método (material ou modo de aplicação) no qual as abelhas aceitassem, pois durante todo o desenvolvimento das abelhas, do ovo até sua emergência, as células de cria permanecem operculadas. Assim, na fase inicial do trabalho, testamos dentro da colônia materiais e formas diferentes de aplicação com agulhas para posteriormente

introduzir os agrotóxicos (glifosato e imidacloprido) no alimento larval, sendo que a segunda parte não foi possível pela inviabilidade dos resultados.

O comportamento das abelhas *S. postica* observado em nossos bioensaios 1 e 2 de remover todas as células de cria, o alimento larval e as larvas após as células serem desoperculadas ou perfuradas, está ligado ao comportamento higiênico das abelhas sem ferrão (TOUFAILIA et al., 2016). As abelhas operárias detectam, desoperculam e removem as crias mortas ou doentes da colônia (LE GROS et al., 2022). Esse comportamento confere proteção em nível de colônia contra as doenças, como os ácaros, varroa, vírus deformador da asa (TEIXEIRA et al., 2020; WILSON-RICH et al., 2009). Quanto mais higiênica for a colônia mais rápida será a detecção de larvas e pupas mortas (NOGUEIRA-NETO, 1997; TOUFAILIA et al., 2016).

Estudos realizados para analisar o tempo de remoção das larvas mortas em abelhas sem ferrão mostraram que as colônias de *Melipona beecheii*, *Scaptotrigona pectoralis*, *Plebeia remota*, *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona depilis* levaram cerca de 252 horas para remover 98%, 132 horas para 99%, 48 horas para 98,4%, 48 horas para 99% e 48 horas para 80%, respectivamente (MEDINA et al., 2009; NUNES-SILVA et al., 2009; TOUFAILIA et al., 2016). Já as abelhas *Tetragonula carbonaria* e *Tetragonula hockingsi* removeram todas as larvas mortas em apenas $9,1 \pm 1,9$ horas e $8,2 \pm 0,9$ horas, respectivamente (LE GROS et al., 2022).

Nossos bioensaios 1 e 2 foram realizados com larvas de primeiro e segundo instar, fato este que pode ter colaborado para a remoção das mesmas pelas abelhas adultas, uma vez que as larvas são mais sensíveis e qualquer alteração na estrutura da célula de cria pode levar as abelhas a detectar aquela larva como um risco a colônia. Na fase de pré-pupa ou pupa esta pequena abertura na célula pode ser aceitável, como relatado por Nogueira-Neto (1997) que para observar a saúde da colônia, fez inspeções rompendo as células de cria ligeiramente para observar a pré-pupa ou a pupa e então as abelhas adultas fecharam o pequeno espaço que porventura foi deixado aberto em cima das células de cria. Porém, a realização da exposição aos agrotóxicos na fase de pupa não atende à necessidade, uma vez que a larva de *S. postica* se alimenta em média até o quinto instar, após esse período não há consumo do alimento (ROSA-FONTANA et al., 2020), assim, não seria possível avaliar o efeito do agrotóxico após a alimentação.

Também foi observado nos nossos bioensaios 1 e 2, a remoção de toda a célula de cria. Este fato acontece porque as abelhas sem ferrão nunca utilizam a mesma célula de cria, elas as destroem após o uso e constroem novas, em contraste com a *A. mellifera*, que as reutilizam (TOUFALIA et al., 2016). Hábito esse desenvolvido pelas abelhas sem ferrão que pode contribuir com maior tolerância às doenças que *A. mellifera*. Outro ponto de diferença entre as abelhas é que as larvas das abelhas sem ferrão se desenvolvem sem contato com o adulto, já as larvas de *A. mellifera* são constantemente alimentadas pelos adultos até cerca de nove dias, pouco antes da larva iniciar a pupação, nesse momento a célula é fechada (MEDINA et al., 2009). Assim, o alto número de visitas para a alimentação em *A. mellifera* provavelmente aumentará a transmissão de patógenos entre células de cria e indivíduos dentro de uma colônia, tornando-a mais suscetível a doenças (MEDINA et al., 2009).

Quando retiramos o disco de cria da colônia e transferimos para uma placa de Petri, cujo ambiente é diferente do natural com temperatura constante, pode ter ocorrido um desequilíbrio favorecendo a proliferação de fungos, como observado no bioensaio 3, podendo ser a causa da morte das larvas. Apesar de não termos identificado o fungo presente no bioensaio, nota-se característica semelhante ao fungo *Zygosaccharomyces sp.* encontrado em colônias de abelhas do gênero *Scaptotrigona* (MENEZES et al., 2015). A interação das larvas das abelhas e fungo acontece naturalmente, as larvas alimentam-se da massa microbiana que é composta em grande parte por fungos simbióticos (MENEZES et al., 2015), fungos estes que quando em condições naturais (dentro da colônia), se proliferam em equilíbrio.

Essa interação entre insetos sociais e microrganismos é comum, pois os ninhos desses insetos fornecem ambientes adequados, condições ambientais estáveis e uma rica fonte de alimento (MUELLER et al., 2005; DE PAULA et al., 2021). Em condições naturais o fungo, *Zygosaccharomyces sp.* está associado ao crescimento da abelha *Scaptotrigona depilis*, e esse fungo requer alto teor de carboidratos e um pH ácido para se desenvolver, condições encontradas em células de cria ricas em açúcar de *S. depilis* (HARTFELDER e ENGELS, 1989; PALUDO et al., 2018). Esse fungo fica em estado dormente no cerume das colônias, quando em contato com o alimento larval, ele entra em fase de crescimento, estende os micélios brancos nas bordas da célula de cria sobre a superfície do alimento, sendo sua proliferação intensa até o terceiro dia do desenvolvimento larval, e depois diminui a quantidade. Após 2 dias o fungo não

é mais observado nas células de cria (MENEZES et al., 2015). Esses micélios produzem precursores de esteroides de que as larvas de *S. depilis* necessitam para pupação (PALUDO et al., 2018; SHANAHAN e SPIVAK, 2021).

O desenvolvimento das abelhas a partir desses bioensaios (1, 2 e 3) apresentou resultados muitíssimo abaixo do método *in vitro*, com índices de emergência igual a zero, enquanto o *in vitro* têm índices de emergência acima de 80% (DORIGO et al., 2019; ROSA-FONTANA et al., 2020). Pela inviabilidade dos testes realizados *in vivo* não foi possível o desenvolvimento de um método do teste de toxicidade para *S. postica*.

5.6. CONCLUSÃO

O comportamento higiênico das abelhas *S. postica* é altamente eficiente removendo qualquer material artificial introduzido na colônia. Além disso, a perfuração do cerume leva a remoção por completo da larva e destruição da célula de cria.

A manutenção dos discos de cria em incubadora é inviável devido à alta proliferação de fungos que saem do controle. O desenvolvimento desse método demanda estudos mais profundos sobre o microecossistema existente na colônia.

Dessa forma, não foi possível estabelecer um método adequado para realização do teste de toxicidade *in vivo*.

5.7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALEIXO, K. P., MENEZES, C., IMPERATRIZ FONSECA, V. L., DA SILVA, C.I. Seasonal availability of floral resources and ambient temperature shape stingless bee foraging behavior (*Scaptotrigona* aff. *depilis*). **Apidologie**, v.48, p. 117–127, 2017.

BRIGANTE, J., COSTA, J. O., ESPÍNDOLA, E. L. G. et al. 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>.

CHAM, K. de O.; REBELO, R. M.; OLIVEIRA, R. de P.; FERRO, A. A; VIANA-SILVA, F. E. DE C.; BORGES, L. DE O.; SARETTO, C. O. S. D.; TONELLI, C. A. M.; MACEDO, T.C. Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília: **Ibama/Diqua**, 114 p, 2020.

CHAM, K. O. et al. Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 36-48, 2019. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/190115>. Acessado em: 09 de novembro de 2022.

DE PAULA, G. T., MENEZES, C., PUPO, M. T., ROSA, C. A. Stingless bees and microbial interactions. **Curr Opin Insect Sci.**, v. 44, p. 41-47, 2021, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.11.006>.

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

DORNELES, A. L., DE SOUZA ROSA, A., 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>.

GRÜTER, C. Stingless Bees. Fascinating Life Sciences. **Springer**, Bristol, UK, 2020. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-60090-7>.

HARTFELDER, K.; ENGELS, W. The composition of larval food in stingless bees: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. **Insectes Soc.**, [s. l.], v. 36, p. 1–14, 1989.

HRNCIR, M., JARAU, S., BARTH, F. G. Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. **J Comp Physiol**, v. 202, p. 597–601, 2016.

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

LE GROS, K. S.; MAKINSON, J. C.; SPOONER-HART, R. N. Hygienic behaviour in the Australian stingless bees *Tetragonula carbonaria* and *T. hockingsi*. **Journal of Apicultural Research**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 578, 2022. <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2109915>.

LOURENÇO, C. T., CARVALHO, S. M., MALASPINA, O. et al. Oral Toxicity of Fipronil Insecticide Against the Stingless Bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 89, p. 921–924, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0773-x>.

MARQUES-SOUZA, A. C., ABSY, M. L., Kerr, W. E. Pollen harvest features of the Central Amazonian bee *Scaptotrigona fulvicutis* Moure 1964 (Apidae: Meliponinae), in Brazil. **Acta Bot. Brasil**, v. 21, p. 11–20, 2007.

MARZINZIG, B.; BRÜNDES, L.; BIAGIONIC, S.; BEHLING, H.; LINK, W.; WESTPHAL, C. Bee pollinators of faba bean (*Vicia faba* L.) differ in their foraging behaviour and pollination efficiency. **AGRICULTURE, ECOSYSTEMS & ENVIRONMENT**, [s. l.], v. 264, p. 24-33, 2018.

MASSARO, F. C., BROOKS, P. R., WALLACE, H. M., RUSSELL, F. D. Cerumen of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*): gas chromatography-mass spectrometry fingerprints and potential anti-inflammatory properties. **Naturwissenschaften**, v. 98, p. 329–337, 2011.

MEDINA, L. M.; HART, A. G.; RATNIEKS, F. L. W. Hygienic behavior in the stingless bees *Melipona beecheii* and *Scaptotrigona pectoralis* (Hymenoptera: Meliponini). **Genet. Mol. Res**, [s. l.], v. 8, n.2, p. 571-576, 2009.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; MARSAIOLI, A. J.; ZAMPIERI, D., FONTOURA, I. C.; LUCHESSI, A. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, [s. l.], v. 25, n.21, p. 2851-2588, 2015.

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.

MICHENER, C. D. The Social Behaviour of the Bees: **A Comparative Study**. Cambridge, MA, USA: **Harvard University Press**, 1974.

MUELLER, U.G., GERARDO, N.M., AANEN, D.K., SIX, D.L., AND SCHULTZ, T.R. The evolution of agriculture in insects. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** [s. l.], v. 36, p. 563-595, 2005.

NOGUEIRA-NETO, P. **A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 1. ed. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

NUNES-SILVA, P. N.; FONSECA, V. L. I.; GONÇALVES, L. S. Hygienic behavior of the stingless bee *Plebeia remota* (Holmberg, 1903) (Apidae, Meliponini). **Genet. Mol. Res.**, [s. l.], v. 8, p. 649-654, 2009.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, sep. 1998.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, n.214, sep. 1998.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure, n.237, jul. 2013.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Honey Bee (*Apis Mellifera* L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding), n.237, oct. 2017.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure, n.237, jul. 2013.

PALUDO, C.R., MENEZES, C., SILVA-JUNIOR, E.A. et al. Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. **Sci Rep**, [s. l.], v. 8, p. 1-10, 2018.

PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**: An international journal on social insects, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

ROSA-FONTANA, A.; DORIGO, A. S.; GALASCHI-TEIXEIRA, J. S.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase? **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 265, part B, p. 1-9, 2020.

SHANAHAN, M.; SPIVAK, M. Resin Use by Stingless Bees: A Review. **Insects**, [s. l.], v. 12, n. 8, p.19, 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12080719>.

SILVA, C.I., Aleixo, K.; Nunes-Silva, Freita, B. M. Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras do Brasil. 1ª Edição. **USP**, São Paulo – SP. 2014.

TEIXEIRA, É. W.; FERREIRA, E. A.; LUZ, C. F. P. D.; MARTINS, M. F.; RAMOS, T. A.; LOURENÇO, A. P. European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. **Journal Invertebr Pathol.**, [s. l.], v. 172, p. 107357, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107357>.

TORRES, A. R., SANDJO, L. P., FRIEDEMANN, M. T., TOMAZZOLI, M. M., MARASCHIN, M., MELLO, C. F., SANTOS, A. R. S. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Braz J Med Biol Res**, v. 51, p. e7118, 2018.

TOUFALIA, H. M. A; ALVES, D.; BENTO, J. M. S.; MARCHINI, L. C.; RATNIEKS, F. L. W. Hygienic behaviour in Brazilian stingless bees. **Biol. Open**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 1712–1718, 2016.

VIT, P., PEDRO, S. R, ROUBIK. D. (eds) Pot-pollen in stingless bee melittology. **Springer**, New York, 2018.

WILLE, A. Biology of the stingless bees. **Annu Rev Entomol** , v. 28, p. 41–64, 1983.

WILSON-RICH, N.; SPIVAK, M.; FEFFERMAN, N. H.; STARKS, P. T. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. **Annu. Rev. Entomol.**, [s. l.], v. 54, p. 405-423, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093301>.

6. CAPITULO 2 – Efeitos da combinação de herbicida e inseticida em abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica*

6.1. INTRODUÇÃO

As abelhas são importantes polinizadores que promovem ou aumentam a produção de frutos e sementes em plantas nativas e cultivadas (MARZINZIG et al., 2018; MICHENER 2013; NOGUEIRA-NETO, 1997). Como é o caso da abelha *S. postica* que poliniza o *Campomanesia pubescens* (conhecida como gabioba), uma planta nativa que produz frutos que estão presentes na alimentação do lobo-guará (BPBES/REBIPP, 2019; BUENO e MOTTA-JUNIOR, 2004; Rodrigues et al., 2017). Porém, ao longo das últimas décadas, a mudança no uso da terra e intensificação da agricultura, principalmente pela utilização dos agrotóxicos, levaram a declínios alarmantes das abelhas e dos serviços ecossistêmicos de polinização (CAMPBELL et al., 2022; GOULSON et al., 2015; ODANAKA e REHAN, 2019; PIRES et al., 2016; SGOLASTRA et al., 2020; ZATTARA e AIZEN, 2021).

As abelhas ficam expostas simultaneamente a diferentes classes de agrotóxicos durante o forrageamento, quando retornam à colônia elas acabam levando esses resíduos (CHAM et al., 2020) que são encontrados nos alimentos da rainha e das larvas (PRADO et al., 2020). Xiao et al. (2022) analisaram a presença de resíduos de 64 tipos de agrotóxicos em pólen, néctar e mel, encontrando pelo menos um ingrediente ativo em 93,6% do pólen, 81,5% do néctar e 49,3% do mel das amostras analisada. Todos esses fatores estressores podem ter efeitos nas paisagens naturais e na viabilidade econômica das culturas agrícolas. Dessa maneira, tornam-se necessários estudos para avaliar os efeitos letais e subletais na sobrevivência das abelhas (ALVARENGA et al., 2020; ELLIS et al., 2010; WILLIANS, 1995).

Os herbicidas e os inseticidas são encontrados em doses baixas na dieta das abelhas (XIAO et al., 2022). Entre os ingredientes ativos (ias) utilizados, o glifosato (N-(phosphonomethyl)glycine) é um herbicida sistêmico mundialmente utilizado e considerado pouco tóxico para as abelhas (PPDB, 2022). Já o imidacloprido (1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine) é um inseticida sistêmico considerado altamente tóxico (PPDB, 2022). Ambos são aplicados em culturas visitadas por abelhas como café, cana-de-açúcar e citros (BPBES/REBIPP, 2019).

Muitos estudos vêm sendo conduzidos sobre os efeitos subletais dos ingredientes ativos glifosato e imidacloprido para as abelhas (ALMEIDA et al., 2021; DAI et al., 2018; LI et al., 2019; MOTTA et al., 2018; SANTOS et al., 2018; TOMÉ et al., 2012). A exposição de abelhas *A. mellifera* ao glifosato acarreta em diminuição do peso larval, da taxa de sobrevivência de larvas e abelhas imaturas e perturbação na microbiota intestinal benéfica, afetando potencialmente a saúde das abelhas e sua eficácia como polinizadores (DAI et al., 2018; MOTTA et al., 2018). Para as larvas da abelha sem ferrão, *Melipona quadrifasciata*, o glifosato se mostrou altamente tóxico causando efeitos letais após sete dias de exposição (SEIDE et al., 2018). Para as abelhas *A. mellifera* a exposição ao imidacloprido pode resultar em diminuição da capacidade de aprendizado olfativo, desorientação de voo e distúrbios na locomoção (LI et al., 2019; SANTOS et al., 2018). Para *M. quadrifasciata* e *Partamona helleri*, pode causar efeitos letais e subletais nas larvas, resultando em alterações neuromorfológicas, prejudicando o comportamento de caminhar em abelhas recém-emergidas que ainda não conseguem voar (ALMEIDA et al., 2021; TOMÉ et al., 2012). Porém, ainda são poucos estudos que investigam a ação combinada desses agrotóxicos, uma situação comum em campo, o que torna difícil determinar seu risco.

Diante desse cenário de exposição, alguns parâmetros quantificam o dano dos agrotóxicos no organismo das abelhas, como é o caso da morfometria que possibilita medir as estruturas e quantificar a sua variação morfológica, através de ferramentas matemáticas (FRANCOY e IMPERATRIZ-FONSECA, 2010; ROHLF e MARCUS, 1993). Por ser um processo bastante preciso e com resultados confiáveis, permite mensurar a diferença entre as espécies (TOFILSKI, 2008), caracterizar aspectos evolutivos (DINIZ-FILHO e MALASPINA, 1995) e também permite medir as diferenças entre os organismos da mesma espécie sob a ação de agentes estressores (DORIGO et al., 2019; SOUZA et al., 2015). Assim, avaliar parâmetros como a distância intertegular das abelhas recém-emergidas nos permite verificar sua capacidade de voo, uma vez que, que os músculos do voo estão inseridos na região intertegular (GREENLEAF et al., 2007).

Entre os parâmetros biológicos, os hemócitos são utilizados para medir a imunidade dos insetos (AMARAL et al., 2010), uma vez que os agrotóxicos causam efeitos na dinâmica dos componentes do sistema imune das abelhas (BRITO et al., 2020; VIANA et al., 2021). Na hemolinfa, as moléculas dos agrotóxicos entram em

contato com mecanismos de defesa inatos, provocando reações humorais e celulares (BRITO et al., 2020). As reações humorais podem ser melanização da hemolinfa, coagulação e produção de peptídeos antimicrobianos (CRUZ-LADIM, 2009). Enquanto a reação celular, os hemócitos desempenham uma grande variedade de funções como fagocitose, secreção de enzimas, coagulação da hemolinfa e nodulação (RICHARDSON et al., 2018). A hemolinfa é constituída por uma parte fluida, o plasma, e elementos figurados, os hemócitos. Os hemócitos podem estar em suspensão no plasma (circulantes) ou aderidos aos órgãos viscerais. Da mesma forma, seu número e tipo variam conforme o estágio de desenvolvimento (RAVAIANO et al., 2018).

Outra rota provável de exposição das abelhas aos agrotóxicos é o sistema digestório, pois é onde ocorrem a absorção das moléculas de substâncias tóxicas, uma vez que as abelhas se alimentam de néctar e pólen que podem conter esses resíduos (CRUZ-LADIM, 2009; BERRIDGE et al., 1969; OLIVEIRA et al., 2019; MIOTELO et al., 2022). É no intestino médio onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e absorção dos produtos da digestão (CRUZ-LADIM, 2009) e também é o órgão onde é possível medir os danos gerados pela exposição, uma vez que qualquer alteração na parte básica e funcional do epitélio pode causar danos a integridade do órgão (GRELLA et al., 2019).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar se a exposição crônica aos agrotóxicos glifosato e imidacloprido de forma isolada e combinada durante o desenvolvimento larval, podem causar alterações no desenvolvimento das abelhas sem ferrão *S. postica*, resultando em um adulto recém-emergido com características diferentes das abelhas não expostas, na imunocompetência de larvas e de recém-emergidas e na histologia do intestino adulto resultante.

6.2. OBJETIVOS

Compreender os possíveis impactos dos agrotóxicos glifosato e imidacloprido de forma isolada e combinada sobre as abelhas sem ferrão *S. postica* expostas na fase larval por meio da análise dos seguintes parâmetros:

- Taxas de mortalidade, pupação, defecação, desenvolvimento e emergência;
- Morfometria da largura da cabeça e distância intertegular em abelhas recém-emergidas;

- Número de células do sistema imune das abelhas nas fases larval e recém-emergidas;
- Histoarquitetura do intestino médio das abelhas recém-emergidas.

6.3. MATERIAL E MÉTODOS

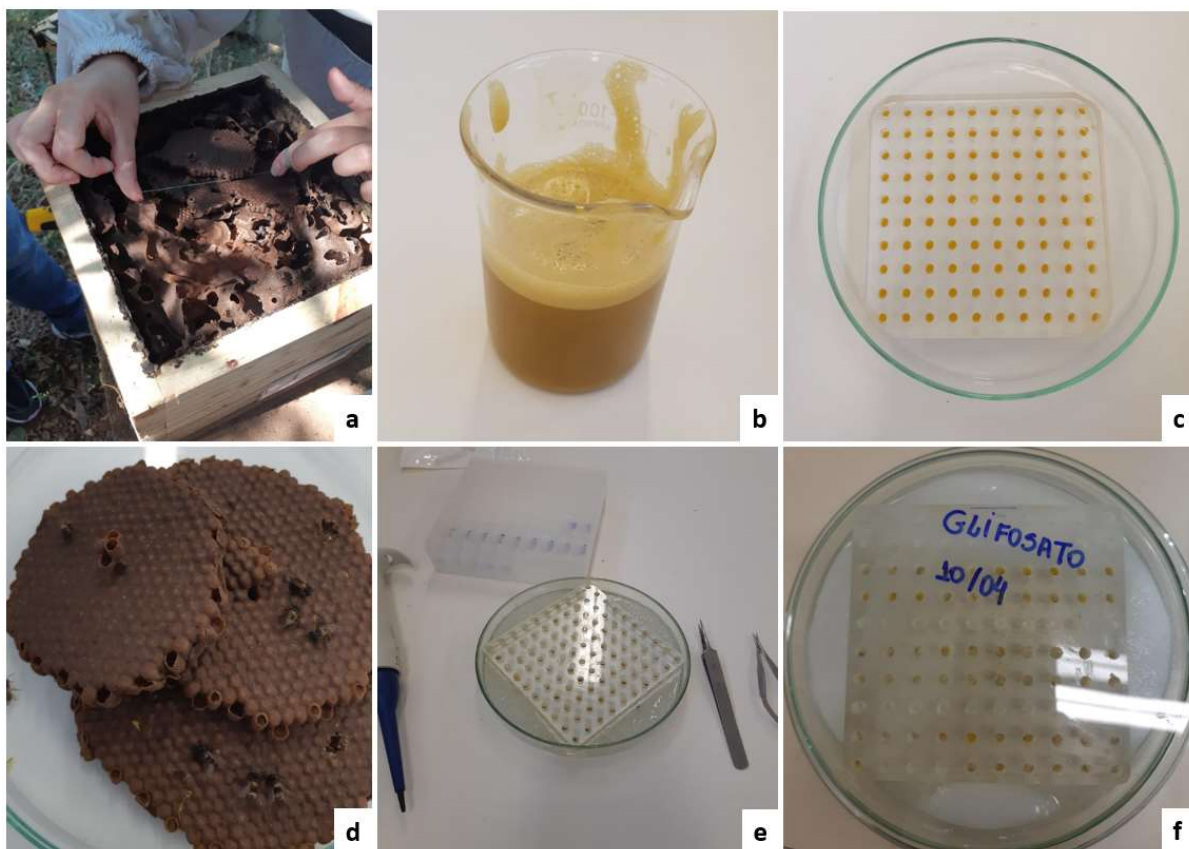
6.3.1. Bioensaio *in vitro*

Os discos de cria contendo as larvas de *S. postica* foram coletados nos meliponários do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, campus de Rio Claro (22°23' 48.851" S; 47° 32'38.234" W) e do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, campus Araras (22°21'25" S, 47°23'03" W). A coleta do material foi realizada na parte da manhã nos horários com temperatura acima de 25°C.

As caixas das colônias foram abertas com cuidado para não danificar os potes de mel e pólen, mantendo assim a homeostase da colônia. As larvas de primeiro instar foram coletadas de três colônias não parentais para garantir a variabilidade genética e em condições ideais para coleta, com grande número de indivíduos e com rainhas jovens (abdômen claros e asas pouco desgastadas). O alimento larval foi coletado de discos de cria contendo os ovos de colônias diferentes daquelas utilizadas para obtenção das larvas a fim de garantir a sobrevivência da colônia. Todo material coletado foi mantido em caixas de plástico (10,3 cm x 21,8 cm x 33 cm) e levadas ao laboratório.

O método adotado para os bioensaios *in vitro* foi baseado em Dorigo et al. (2019) e Rosa-Fontana et al. (2020). Antes de iniciar os bioensaios, o laboratório foi preparado com umidificador (Mondial, Modelo UA-05) para manter a umidade relativa do ar acima 75% evitando que os alimentos e larvas se desidratassem e com aquecedor (Mondial, Modelo A-08) para manter a temperatura superior a 25°C. Todo manuseio dos discos de cria, preparo do alimento larval e transferência das larvas foi realizado no laboratório. As placas de acrílico utilizadas no ensaio eram com dimensões semelhantes das células naturais de crias com 100 poços cada (Rosa-Fontana et al., 2022). Elas foram higienizadas e colocadas dentro de placas de Petri de vidro com tampa (1,5 cm x 20 cm), conforme Figura 11.

Figura 11 – Fotos do preparo dos bioensaios *in vitro*. As larvas de *Scaptotrigona postica* foram expostas ao alimento larval com glifosato, imidacloprido, mistura e controle (sem contaminantes); (a) coleta dos discos de cria; (b) alimento larval; (c) placa de acrílico contendo poços com o alimento larval; (d) discos de cria com as larvas de 5º instar; (e) e (f) placa de acrílico com o alimento e as larvas prontas para incubação (Autoria própria).



As células de cria contendo os ovos foram desoperculadas, o alimento larval foi coletado com micropipeta (Olen - K1-1000C, K1-100C) e colocado em tubo de ensaio para posterior mistura e homogeneização com os agrotóxicos.

Os ingredientes ativos glifosato (marca Sigma Aldrich, lote: BCBZ6585, CAS: 1071-83-6, pureza 98,1%) e imidacloprido (marca: Sigma Aldrich, lote: BCBZ3018, CAS 138261-41-3, pureza: 99,9%) foram pesados e diluídos diretamente no alimento larval. A partir de uma solução estoque de 1000 ng i.a./ μ L (10 mg do ingrediente ativo e 10 mL do alimento larval), sucessivas diluições (Figura 12) foram realizadas com o alimento para atingir as concentrações a serem fornecidas às larvas. O mesmo procedimento foi realizado com a mistura dos ingredientes ativos, partindo de uma solução estoque de 1000 ng i.a./ μ L (10 mg do glifosato + 10 mg de imidacloprido e

10 mL do alimento larval; Figura 13). Foram definidos quatro grupos experimentais: D1 – controle (alimento larval sem adição dos ingredientes ativos), D2 – 0,2 ng/ μ L de glifosato em alimento larval, D3 – 0,2 ng/ μ L de imidacloprido em alimento larval e D4 – 0,2 ng/ μ L de glifosato e imidacloprido em alimento larval.

As concentrações dos ingredientes ativos foram determinadas por meio da dose de campo (480 g/ha de glifosato e 0,3 g/ha de imidacloprido) mais alta comumente aplicada para o controle de plantas indesejáveis e insetos, utilizando a planilha eletrônica BeeRex, que permite calcular as concentrações ambiental estimada (CAE) dos agrotóxicos aos quais as abelhas podem estar expostas no pólen e néctar das flores. Esta planilha é utilizada para avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas pelo IBAMA (CHAM et al., 2020).

Figura 12 – Cascata da diluição para os ingredientes ativos glifosato e imidacloprido no alimento larval (Autoria própria).

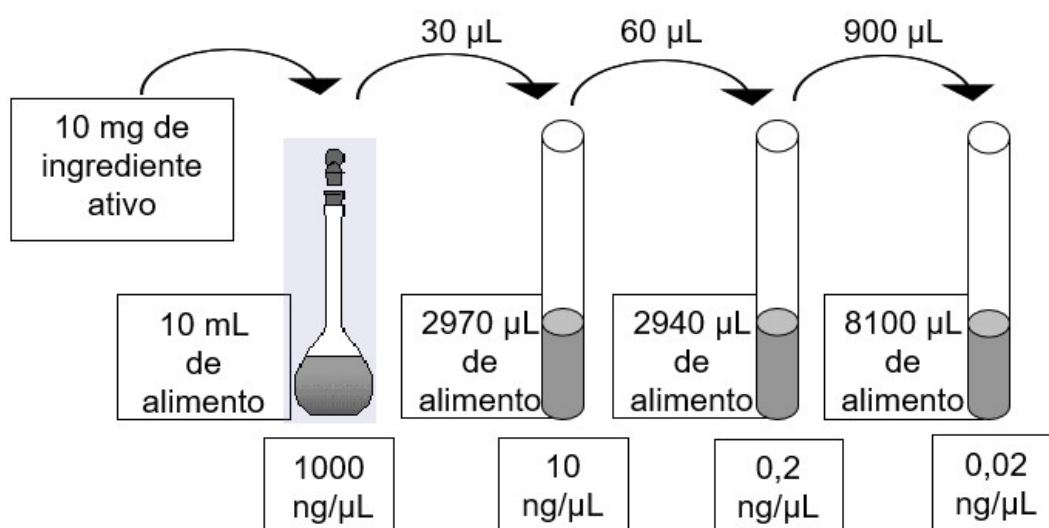
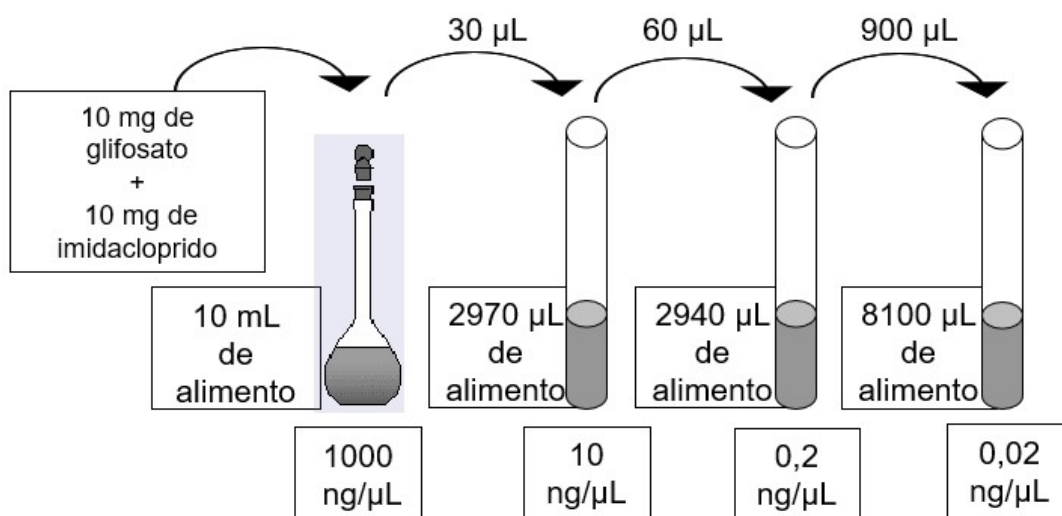


Figura 13 – Cascata de diluição para mistura dos ingredientes ativos glifosato e imidacloprido no alimento larval (Autoria própria).



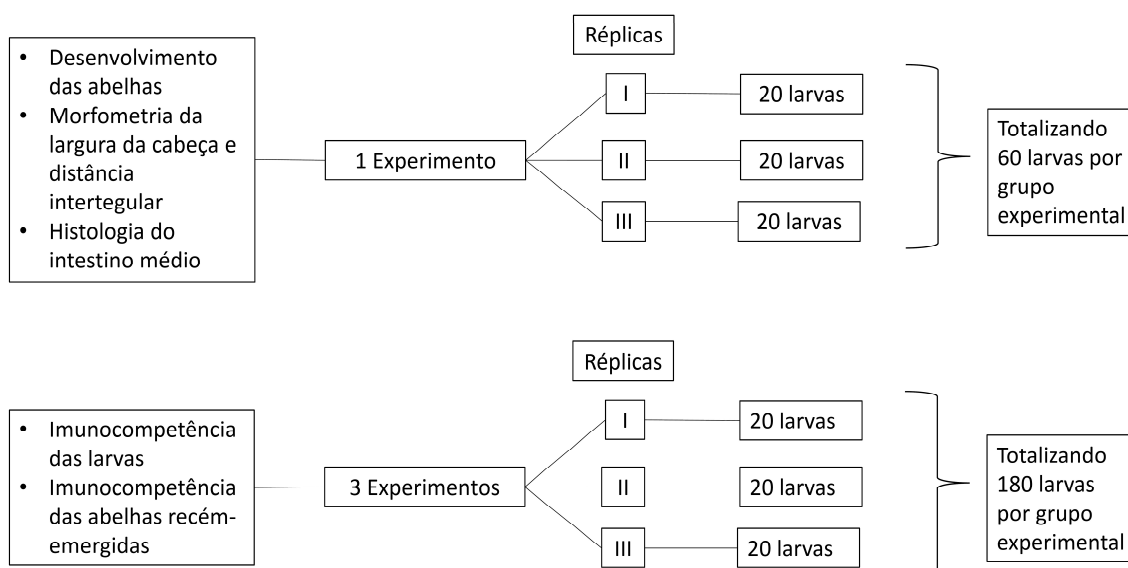
Uma alíquota de 25 μL de cada grupo experimental foi distribuída nas células das placas de acrílico e, logo após as larvas foram transferidas com o auxílio de uma agulha de enxertia. Como as larvas das abelhas consomem todo o alimento larval depositado na célula de cria, é possível determinar a concentração total ingerida, multiplicamos cada valor por 25, para obter as concentrações em ng de i.a./larva: 0,5 ng de glifosato/larva, 0,5 ng de imidacloprido/larva e 0,5 ng de glifosato e imidacloprido/larva.

Após a transferência, as placas de Petri foram preenchidas com água destilada e mantidas em incubadoras BOD (Biochemical Oxygen Demand - TE-371L) a temperatura de 30°C ± 2 e umidade relativa do ar de 95% ± 2. Após 72 horas da transferência, para manter a umidade relativa do ar ideal para a criação das larvas, foi adicionado uma solução de cloreto de potássio (KCl) na placa de Petri. Depois de 48 horas da adição da solução de KCl, a solução foi removida e substituída por uma solução de cloreto de sódio (NaCl). O KCl e o NaCl foram usados para manter a umidade em 85 e 75%, respectivamente. As placas permaneceram na incubadora até a emergência das abelhas (~ 34 dias).

Os bioensaios foram realizados conforme esquema demonstrado na Figura 14, em intervalos de aproximadamente 30 dias para que não prejudicasse o desenvolvimento das colônias. No geral, cada execução do experimento durou em

média 34 dias, com exceção do experimento para avaliar a imunocompetência das larvas de quinto instar que foi encerrado após cinco dias.

Figura 14 – Esquema da condução dos bioensaios realizados *in vitro* para avaliação dos parâmetros: desenvolvimento das abelhas, morfometria da largura da cabeça e distância intertegular, histologia do intestino médio, imunocompetência das larvas, imunocompetência das abelhas recém-emergidas (Autoria própria).



6.3.2. Desenvolvimento das abelhas *S. postica*

Os parâmetros utilizados para indicar os estágios de desenvolvimento das abelhas foram os mesmos utilizados por Dorigo et al. (2019). O desenvolvimento das abelhas foi avaliado por meio de observações e registros diários do consumo da alimentação, da taxa de defecação, emergência e taxa de mortalidade das abelhas, após a exposição das larvas aos grupos experimentais. Os indivíduos foram considerados mortos quando não foi observado movimentação dos espiráculos (nas larvas) ou quando a coloração estivesse escura no tegumento (nas larvas e pupas), por meio de observação em estereomicroscópio (Leica EZ4 HD). Os indivíduos mortos foram contabilizados e removidos.

6.3.3. Morfometria das abelhas recém-emergidas

Os parâmetros morfométricos da largura da cabeça e da distância intertegular foram avaliados nas abelhas recém-emergidas para comparar a similaridade entre elas e possíveis deformações após a exposição aos grupos experimentais (DORIGO et al., 2019). As medidas foram obtidas por meio de imagens em estereomicroscópio com câmera acoplada (Leica M 205 C) e o software LAS V4.8, utilizando o modo de medição do próprio software para analisar possíveis assimetrias. A morfometria dos indivíduos recém-emergidos dos grupos experimentais foi comparada com os indivíduos recém-emergidos do grupo controle.

6.3.4. Imunocompetência das abelhas

O protocolo seguido para extração da hemolinfa em larvas e abelhas recém-emergidas foi o proposto por Butolo et al. (2020) para as abelhas *A. mellifera* e adaptado para a *S. postica*. Por meio dos bioensaios *in vitro*, a coleta da hemolinfa das larvas de quinto instar foi realizada com uma pequena incisão na região da cabeça com a tesoura oftalmológica, depois aplicou-se uma leve pressão sobre o corpo até o extravasamento da hemolinfa. Nas abelhas adultas (recém-emergidas), foi retirada a cabeça com a tesoura oftalmológica e o líquido da hemolinfa coletado da abertura proximal do tórax. O líquido da hemolinfa foi coletado com o auxílio da micropipeta automática e acondicionado no microtubo de 1,5 mL para posterior análise. Devido a quantidade de hemolinfa extraída tanto das larvas como das abelhas recém-emergidas não ser suficiente para realizar a contagem, foi realizado um pool de duas larvas e três abelhas recém-emergidas para contagem, totalizando 90 larvas por tratamento e 135 abelhas recém-emergidas. Qualquer fluído com coloração amarelada ou marrom, característica de fluido gástrico, foi evitado.

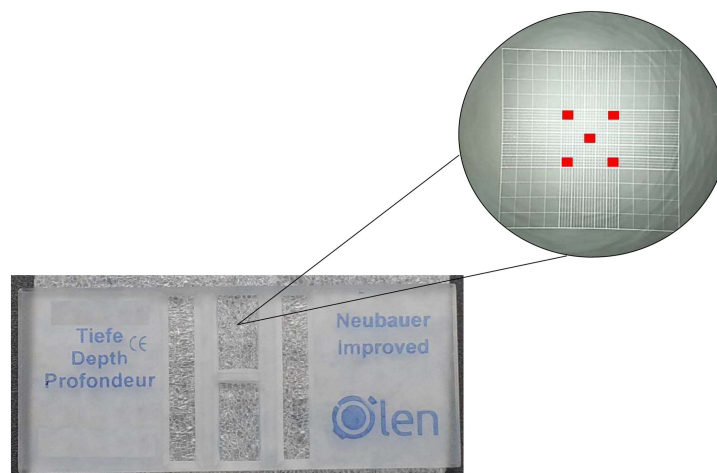
Para a contagem dos hemócitos, 5 μ L da hemolinfa foram adicionados em 5 μ L do corante azul de metileno, em uma proporção de 1:1 (v:v). Após a mistura, alíquotas da mistura (hemolinfa + corante) foram colocadas em câmara de Neubauer e realizada a contagem de 5 quadrantes da câmara (Figura 15) com o auxílio do microscópio de luz de campo claro com uma objetiva de 40X, proporcionando um aumento de 400X.

Após a contagem, o número de hemócitos foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Hemócitos/mL} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de hemocitos contados}}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{F.D.} \times \text{F.C.} \quad \text{Equação 2}$$

Onde, o fator de diluição (F.D.) utilizado de todas as amostras foram dois e o fator de correção (F.C.) foi 10^4 , número este pré-estabelecido para a câmara de Neubauer. Como foi realizado um pool de larvas e abelhas recém-emergidas, para obter o número de hemócitos por larva ou abelha, o número obtido no cálculo foi dividido por dois (larva) e três (abelha recém-emergida).

Figura 15 – Imagem da câmara de Neubauer e o aumento dos quadrantes. Foi utilizada para contagem total dos hemócitos circulantes na hemolinfa das abelhas expostas a diferentes tratamentos (Autoria própria).



6.3.5. Histologia do intestino médio das abelhas recém-emergidas

Cinco abelhas recém-emergidas (com até 48 horas) de cada grupo experimental (D1, D2, D3 e D4) foram dissecadas para retirar o intestino médio, utilizando um estereomicroscópio (Leica EZ4 HD). Os órgãos retirados foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% por 24 horas e estabilizado em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS) pH 7,4, por mais 24 horas para manter o pH constante. O material passou por uma desidratação lenta sob refrigeração em

concentrações crescentes de álcool (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90% 95% e 100%) a 4°C (SILVA-ZACARIN et al., 2011).

Após a desidratação, os órgãos foram incluídos em historesina em placas histomoldes por 24 horas até a polimerização do material formando blocos, seguindo o protocolo padrão para inclusão em Leica Historesin®, seguindo o manual de instruções do fabricante. Os blocos foram fixados em cubos de madeira (1,5 cm x 1,5 cm) e submetidos a cortes histológicos de 5 µm de espessura obtidos com micrótomo (RM225 Leica). As secções foram colocadas em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina e eosina.

Conforme protocolo estabelecido por Junqueira e Junqueira (1983), as lâminas foram colocadas em água destilada por 1 minuto, submetidas à hematoxilina aquosa por 10 min, enxaguadas com água destilada por 5 minutos e lavadas em água corrente por 1 minuto. Após esse processo, as lâminas foram coradas com eosina por 5 minutos e novamente lavadas em água corrente por 1 minuto.

Posteriormente, as lâminas foram secadas e montadas com DPX, um meio de montagem permanente. Após a secagem e limpeza das lâminas, os cortes foram analisados e fotografados em microscópio de luz Olympus BX51 com software LAS V4.4 controlador DP para aquisição de imagens em aumento de 40x. Foram confeccionadas oito lâminas para cada um dos cinco indivíduos, contendo em média oito cortes por lâmina.

As imagens foram analisadas pelo programa de processamento de imagens ImageJ e o método aplicado foi baseado em Grella et al. (2019). A gravidade do dano observado no intestino foi determinada através de um valor de escore. Foram selecionadas 15 fotomicrografias para cada grupo.

As células do epitélio do intestino médio das abelhas recém-emergidas foram avaliadas para perda de material citoplasmático, borda em escova e inchaço celular, foi calculado a média de 3 medições em diferentes regiões da imagem com aumento final de 400x e para as alterações como eliminação de células, picnose e quantidade de ninhos de células regenerativas foram realizada pela contagem das células afetadas com relação ao número total de células e ninhos na imagem inteira, os resultados foram obtidos em porcentagem. As análises de secreção apócrina e esferocristais foram realizadas utilizando contraste de imagem, os resultados foram obtidos pela porcentagem da área mais escura em relação a área total da imagem.

As alterações no intestino foram avaliadas com base nos parâmetros estabelecidos por Grella et al., 2019, no qual foi atribuído um escore (Tabela 1) de acordo com a grau de importância do dano patológico que a alteração afeta o órgão analisado. Com base nesses dados foi multiplicado o valor do escore da alteração celular pelo valor da frequência da alteração da célula.

Assim, as alterações celulares foram classificadas em três níveis, com base na relevância do dano: grau 1 representa um dano mínimo e reversível quando exposto a um agente tóxico; grau 2 representa um dano moderado, qual é possível reverter na maioria dos casos; e grau 3 representa dano grave, normalmente irreversível e que pode causar dano parcial ou total no órgão avaliado. Já a frequência das alterações celulares foi atribuída aos valores de 0, 2, 4 e 6, onde 0 representa a ausência de alteração e 6 representa uma alta frequência

Tabela 1 – Escore estabelecido para as alterações nas células do intestino e a frequência/amplitude do dano de ocorrência de cada alteração para a abelha *Scaptotrigona postica*

Alteração nas células do intestino médio	Escore	Frequência/Amplitude da frequência da alteração celular		
		2*	4*	6*
Aumento da secreção apócrina	1	0 a 0,25	0,26 a 0,51	0,52 a 0,77
Aumento da eliminação de células	1	3,3 a 10,8	10,81 a 18,31	18,32 a 26,32
Esferocristais	1	0 a 0,1	0,11 a 0,2	0,21 a 0,31
Alteração no Borda em escova	2	10,22 a 13,72	7,21 a 10,21	4,2 a 7,2
Perda de material citoplasmático	2	2,1 a 4,5	4,51 a 6,9	6,91 a 9,8
Perda dos ninhos de células regenerativas	3	0 a 33	34 a 66	67 a 100
Picnose	3	0 a 2,8	2,81 a 5,61	5,62 a 8,42

*Frequência de ocorrência de cada alteração celular.

Fonte: Adaptado de Grella et al., 2019.

6.3.6. Análise Estatística

Os dados referentes aos efeitos adversos da exposição aos agrotóxicos dos parâmetros de mortalidade, morfométricos (distância intertegular e largura da cabeça) e contagem dos hemócitos foram analisados inicialmente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, não atenderam os pressupostos de normalidade e foram considerados não-paramétricos. Então, os resultados foram submetidos a análise estatística comparativa através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo post-hoc de Dunn e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Por meio do software R (versão 4.1.0, R Foundation for Statistical Computing, 2021).

Para o parâmetro da histologia do intestino médio, os dados foram analisados inicialmente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, não atenderam os pressupostos de normalidade e foram considerados não-paramétricos. Após os resultados foram submetidos a análise estatística de comparação, com a utilização do teste Friedman e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$, utilizando o pacote *agricole* no software R (versão 4.1.0, R Foundation for Statistical Computing, 2021).

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Desenvolvimento das abelhas sem ferrão

Os resultados obtidos após a exposição aos grupos experimentais (D1, D2, D3 e D4) estão demonstrados na Tabela 2, a qual evidencia a mortalidade obtida em cada grupo experimental e a duração de cada fase do desenvolvimento das abelhas *S. postica*. Nenhuma rejeição das dietas (D1, D2, D3 e D4) foi observada nos bioensaios com as larvas, que ingeriram todo o conteúdo até o 5º instar e nem a defecação foi alterada, no sétimo dia todas as larvas já tinham defecado.

As fases de desenvolvimento (Figura 16) dos indivíduos expostos aos grupos experimentais não foram alteradas e nem seu desenvolvimento. Apresentam no 14º dia pupa com olho branco, no 16º dia pupa com olho rosa, 19º dia pupa de olho e no 34º dia as abelhas emergiram. A taxa de pupação e a taxa de emergência foi de 100% para todos os grupos. Também não foi observada nenhuma alteração na coloração da cabeça, tórax e abdome dos indivíduos formados.

A taxa de mortalidade das larvas foi significativamente diferente do controle no D3 ($p = 0,0487$) e nos demais grupos D2 e D4 não houve diferenciação, $p = 0,293$ e $p = 0,521$, respectivamente.

Figura 16 – Desenvolvimento larval da *Scaptotrigona postica* até sua emergência visto em estereomicroscópio. (a) larva de 1° instar, dentro da célula de cria com o alimento larval; (b) larva de 5° instar; (c) pupa de olho branco; (d) pupa de olho rosa; (e) pupa de olho preto; (f) abelha recém emergida (Autoria própria).

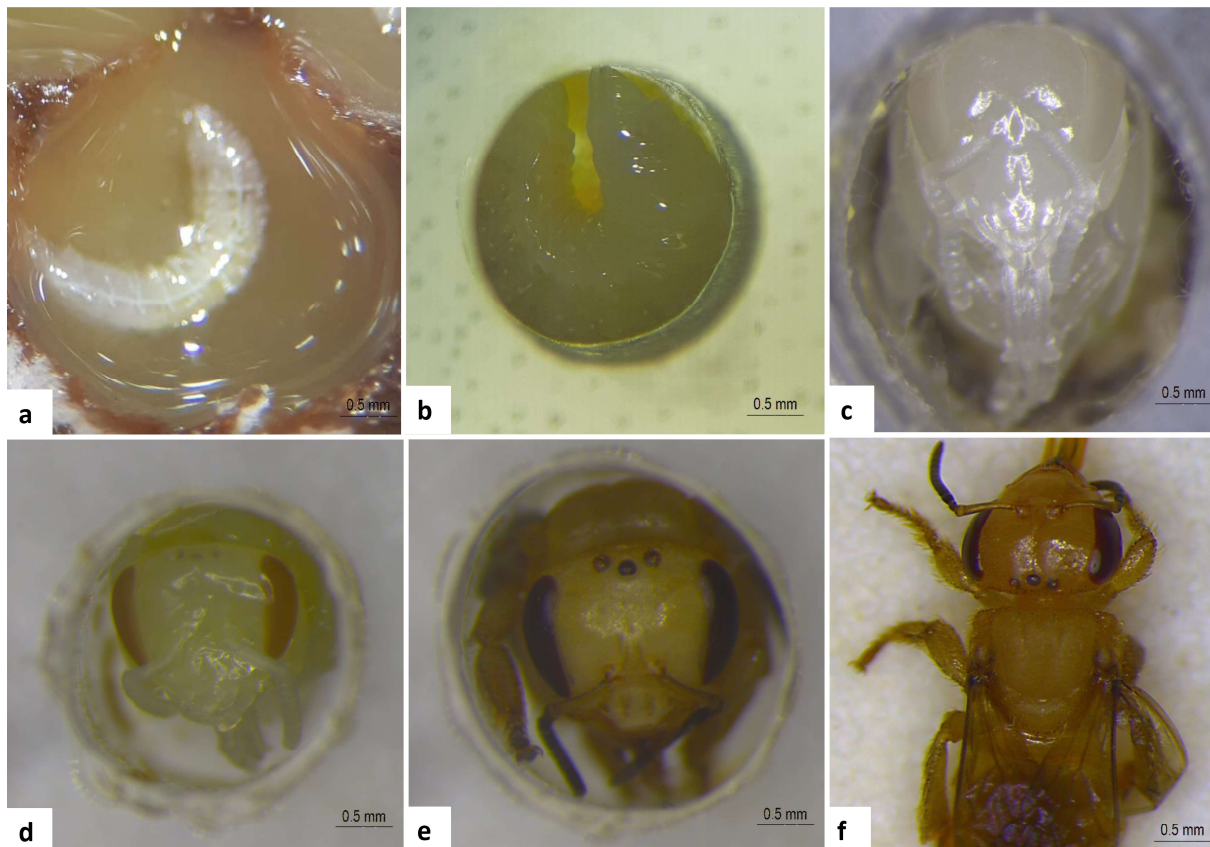


Tabela 2 – Fases observadas do desenvolvimento das abelhas *Scaptotrigona postica* após a exposição crônica via oral aos grupos experimentais: controle (D1 - sem ingredientes ativos), glifosato (D2), imidacloprido (D3) e mistura (D4)

Grupo	n	Mortalidade de larvas ⁽¹⁾ (%)	Presença de Alimento no Quinto Dia ⁽²⁾	Defecação no Quinto Dia ⁽²⁾	Emergência ⁽³⁾
D1	30	0,00 ± 0,00 a	Não	Sim	34 ± 0,25 a
D2	30	10,00 ± 0,31 a, c	Não	Sim	34 ± 0,35 a
D3	30	30,00 ± 0,47 b, c	Não	Sim	34 ± 0,18 a
D4	30	13,33 ± 0,35 a, c	Não	Sim	34 ± 0,18 a

⁽¹⁾ Número de larvas mortas / número inicial de larvas da amostra.

⁽²⁾ Valor médio do estágio de desenvolvimento dos organismos.

⁽³⁾ Os números indicam os dias exatos em que os eventos ocorreram.

n - Número de larvas.

± Indica o desvio padrão.

Dados seguidos por letras iguais não apresentam diferença significativa (Teste post-hoc de Dun, $p < 0,05$).

6.4.2. Morfometria das abelhas recém-emergidas

A morfometria da distância intertegular (DI) e da largura da cabeça (LC) das abelhas recém-emergidas dos grupos experimentais (D1, D2, D3 e D4) foram medidas conforme Figura 17 e os dados estão demonstrados na Tabela 3 e Figuras 18 e 19.

Nossos resultados evidenciam diferenças significativas quando os grupos são comparados entre si e com o controle. Para a DI apresentaram diferenças nos grupos D1 e D2 ($p = 0,0022$), D2 e D3 ($p = 0,0004$), D2 e D4 ($p = 0,0023$) e LC nos grupos D1 e D2 ($p = 0,00008$), D1 e D4 ($p = 0,0162$) e D2 e D3 ($p = 0,0122$), de acordo com tabela 2.

Não encontramos efeitos da ação do ingrediente ativo imidacloprido nas medidas da DI e LC quando comparados com o controle ($p > 0,05$). O glifosato causou efeitos tanto na DI como na LC. Já a mistura entre os ingredientes ativos, causou efeitos similares ao pior caso para a LC, o glifosato está mantendo seu efeito negativo nas medidas de LC, e para as medidas de DI, a mistura não causou uma soma dos efeitos, ou seja, não foi aditivo. Neste caso, o imidacloprido está diminuindo a ação do glifosato.

Figura 17 – Medidas anatômicas da largura da cabeça e distância intertegular da abelha *Scaptotrigona postica* (Autoria própria).



Tabela 3 – Morfometria da distância intertegular e largura da cabeça das abelhas *Scaptotrigona postica* recém-emergidas após a exposição crônica via oral aos grupos experimentais: controle (D1 - sem ingredientes ativos) e com glifosato (D2); imidacloprido (D3) e mistura (D4)

Grupo	n	Distância Intertegular	Largura da Cabeça
		Média / DP (mm)	Média / DP (mm)
D1	15	11,56 ± 7,74 a	9,64 ± 7,17 a
D2	15	9,89 ± 14,75 b	7,91 ± 9,61 b
D3	15	11,78 ± 6,74 a, c	9,5 ± 5,73 a
D4	15	11,34 ± 16,42 a, c	8,7 ± 10,77 b

n - Número de abelhas.

DP – Desvio padrão.

Dados seguidos por letras iguais não apresentam diferença significativa (Teste post-hoc de Dun , $p < 0,05$).

Figura 18 – Boxplot dos dados de morfometria da distância intertegular das abelhas *Scaptotrigona postica* recém-emergidas nos grupos experimentais: controle (D1 - sem ingredientes ativos), glifosato (D2), imidacloprido (D3) e mistura (D4).

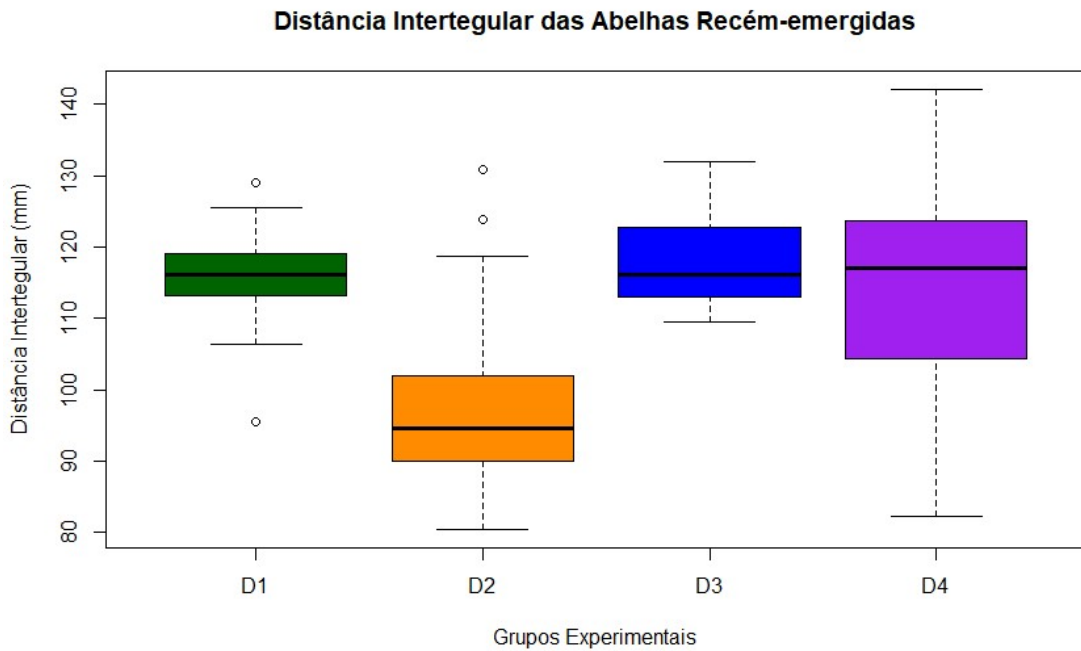
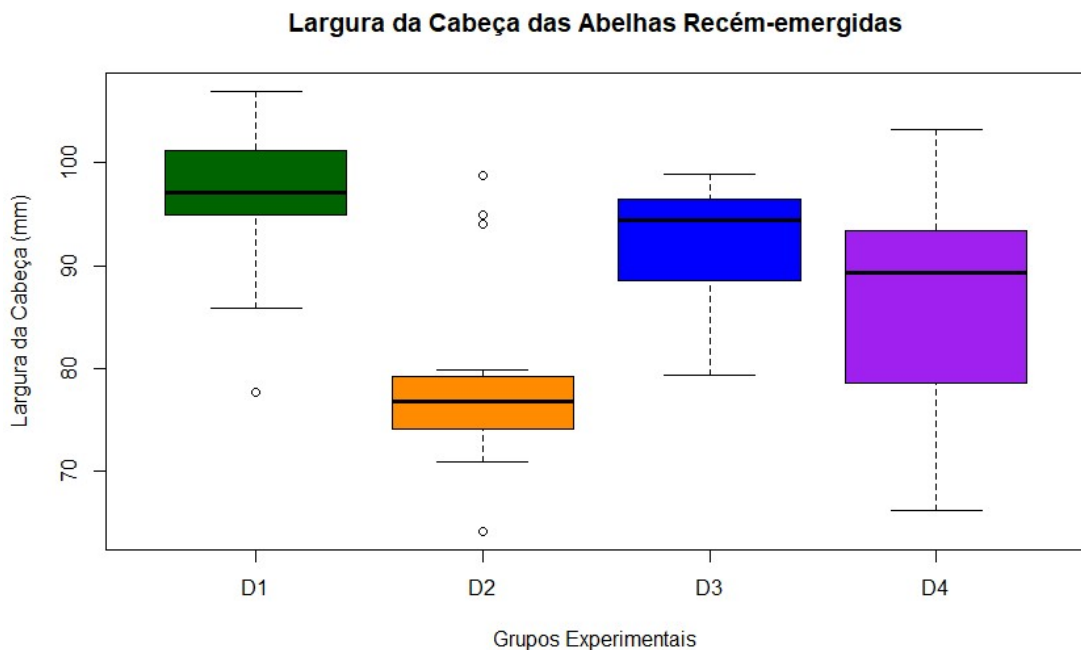


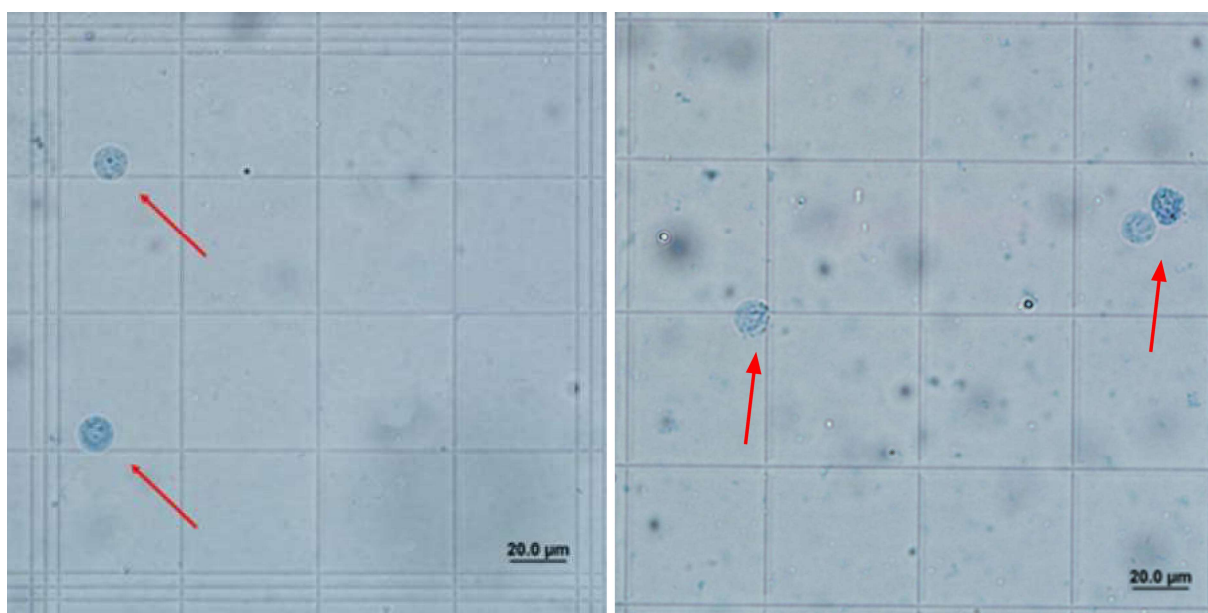
Figura 19 – Boxplot dos dados de morfometria da largura da cabeça das abelhas *Scaptotrigona postica* recém-emergidas nos grupos experimentais: controle (D1 - sem ingredientes ativos), glifosato (D2), imidacloprido (D3) e mistura (D4).



6.4.3. Imunocompetência das abelhas adultas

As contagens totais de hemócitos foram realizadas como uma medida indireta da imunocompetência celular basal. O número médio de hemócitos totais por mililitro circulante na hemolinfa das larvas de quinto instar e das abelhas recém-emergidas expostas aos grupos experimentais, foram contados e calculados, conforme equação 2 e estão apresentados na Tabela 4. Na Figura 20 é possível observar uma amostra de hemolinfa com hemócitos circulante das abelhas *S. postica* obtidos nos bioensaios.

Figura 20 – Fotomicrografias da câmara de Neubauer contendo amostras de hemolinfa de larvas de quinto instar de *Scaptotrigona postica*. As setas indicam os hemócitos encontrados nos bioensaios (Autoria própria).



A exposição a todos os grupos (D2, D3, D4) não reduziu significativamente a contagem total dos hemócitos das larvas de quinto instar. Já para as abelhas recém-emergidas demonstram diferenças significativas quando comparados com o controle e entre si, para os grupos D1 e D3 (0,0374), D1 e D4 (0,0004), D2 e D3 (0,0004), D2 e D4 (0,0000004) e nos grupos D3 e D4 não apresentaram diferenças significativas.

Tabela 4 – Número médio de hemócitos/mL circulantes na hemolinfa de *Scaptotrigona postica* após a exposição crônica via oral aos grupos experimentais controle (D1 - sem ingredientes ativos), glifosato (D2), imidacloprido (D3) e mistura (D4)

Grupo	Larvas de quinto instar		Abelhas recém-emergidas	
	n	Média (hemócitos/mL)	n	Média (hemócitos/mL)
D1	45	7.689 a	30	4.178 a
D2	45	9.156 a	30	2.311 a, b
D3	45	10.978 a	30	3.644 c
D4	45	8.579 a	30	5.867 c

n- pool de larvas/abelhas.

Dados seguidos por letras iguais não apresentam diferença significativa (Teste post-hoc de Dun, $p < 0,05$).

As larvas do controle apresentaram uma densidade de hemócitos mais alta do que as abelhas recém-emergidas. A exposição ao imidacloprido e mistura afetou significativamente a densidade de hemócitos e para o glifosato não se diferenciou estatisticamente do controle. Nas Figuras 21 e 22, observa-se a distribuição dos dados dos hemócitos circulantes na hemolinfa de larvas de quinto instar e de abelhas recém emergidas para cada grupo experimental.

Figura 21 – Boxplot do número de hemócitos circulantes na hemolinfa das larvas de 5^o expostas aos grupos experimentais: controle (D1 - sem ingredientes ativos); glifosato (D2); imidacloprido (D3) e mistura (D4).

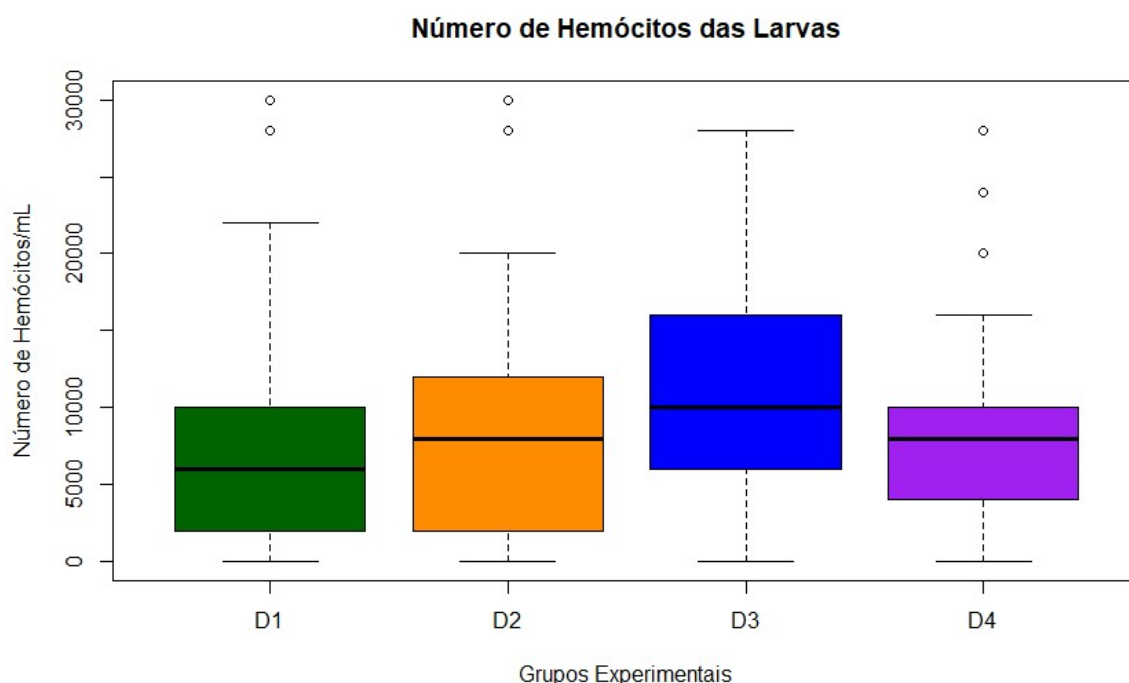
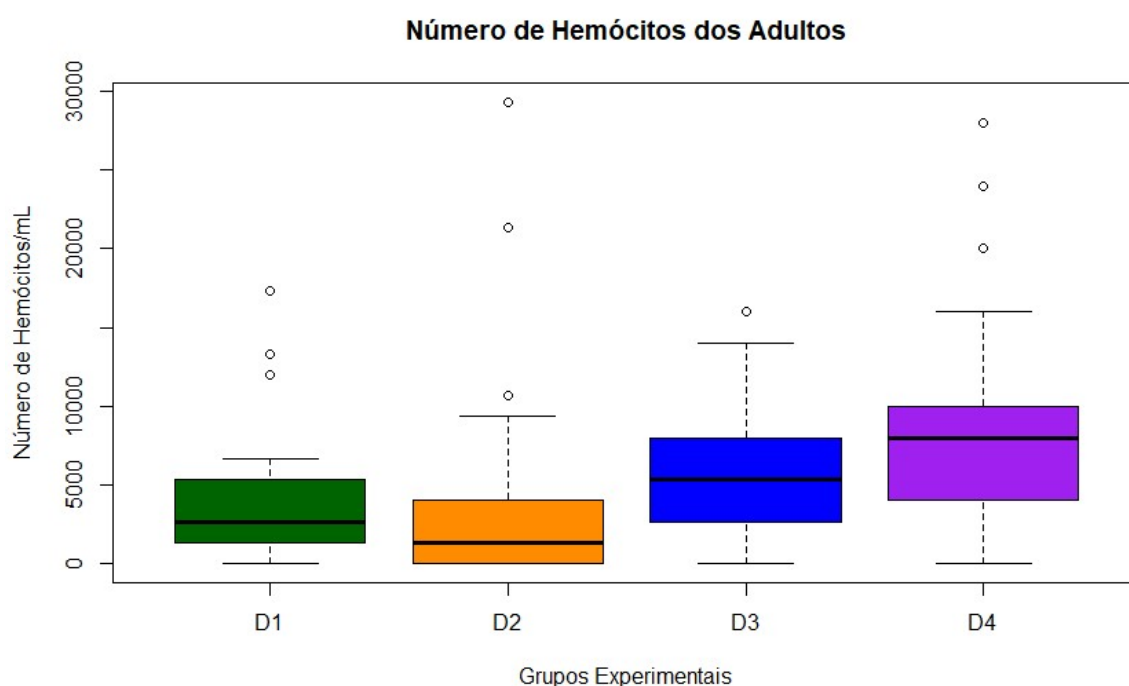


Figura 22 – Boxplot do número de hemócitos circulantes na hemolinfa das abelhas recém-emergida expostas aos grupos experimentais: controle (D1 - sem ingredientes ativos); glifosato (D2); imidacloprido (D3) e mistura (D4).



6.4.4. Histologia do intestino médio das abelhas recém-emergidas

Analizamos a histologia do intestino médio das abelhas *S. postica* recém-emergidas e a média dos índices dos diferentes parâmetros estão demonstrados na Tabela 5. Os parâmetros de perda de material citoplasmático, perda de borda em escova e eliminação de células para o lúmen apresentaram diferenças significativas em relação ao controle, enquanto picnose, liberação de secreção apócrina e esferocristais não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle.

O intestino médio de recém-emergidas do grupo controle apresentou microvilosidades intactas e as células digestivas com uma borda em escova evidente (média: $5,92 \pm 1,86$ μm de altura), enquanto nos grupos com glifosato, imidacloprido e mistura, houve uma diminuição acentuada na altura da borda em escova das células digestivas (média: $1,68 \pm 0,70$ μm de altura - glifosato; média: $2,12 \pm 0,60$ μm de altura - imidacloprido; média: $1,98 \pm 0,59$ μm de altura - mistura).

No controle, não foram evidenciadas alterações nos padrões morfológicos, foi possível notar a presença de células regenerativas dispostas na base do epitélio formando ninhos de células regenerativas, borda em escova na região apical das células e vilosidades com fibras musculares viscerais intactas e um epitélio simples de células prismáticas.

Entretanto, nos grupos expostos com os agrotóxicos foi possível observar alterações nos padrões morfológicos tais como vilosidades irregulares com eliminação de células para o lúmen, diminuição da borda em escova, perda do material citoplasmático em volta das células principais e ninhos regenerativos alterados.

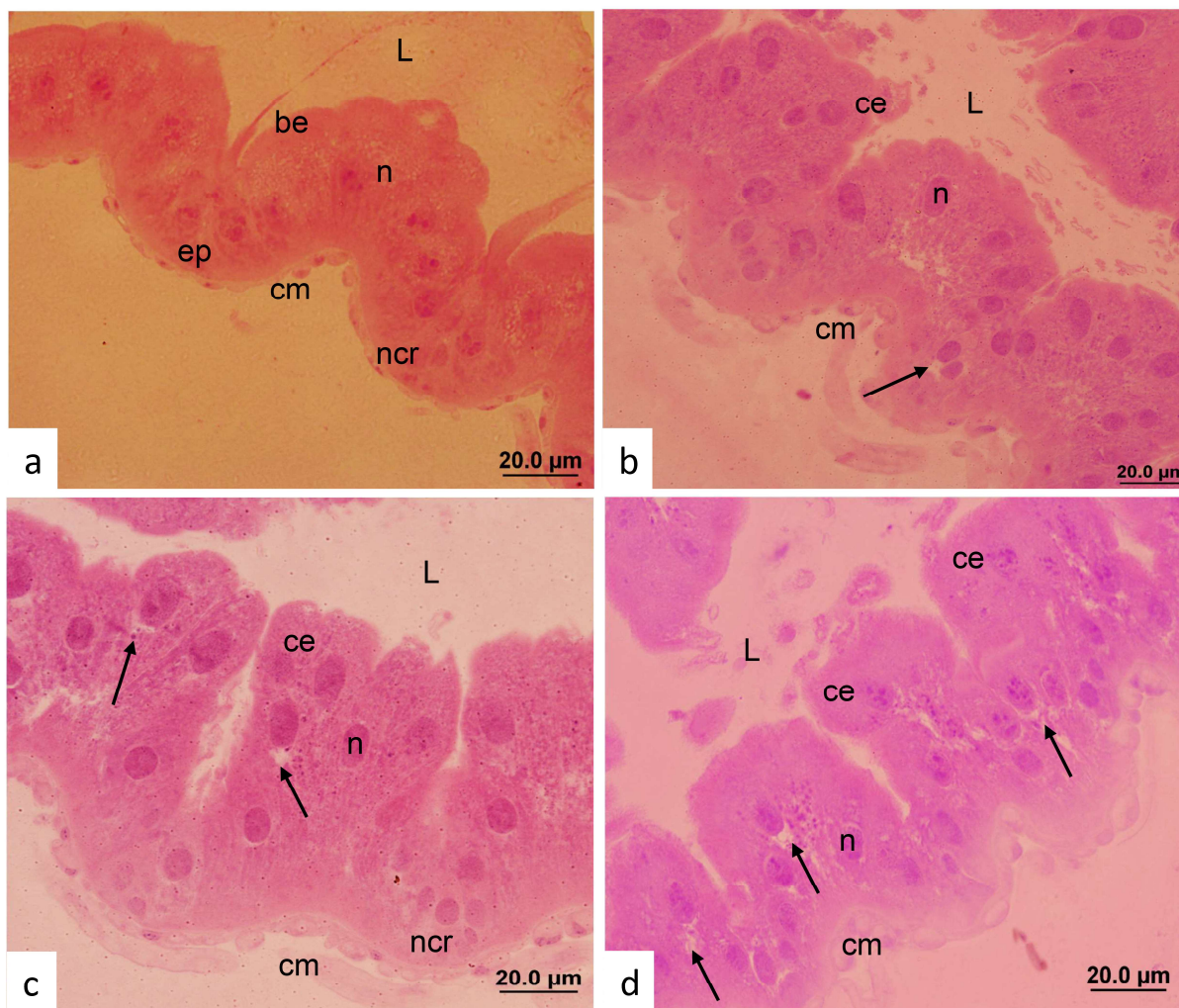
Tabela 5 – Valores da média e desvio padrão das alterações encontradas no intestino médio das abelhas recém-emergidas expostas aos grupos: controle (D1 - sem ingredientes ativos); glifosato (D2); imidacloprido (D3) e mistura (D4)

Grupo	SA	ESF	PMC	PBE	ECL	PNCR	PIC
D1	2 ± 0 a	2 ± 0 a	0 ± 0 a	15,2 ± 1,62 a	0 ± 0 a	3 ± 0 a	6 ± 0 a
D2	2 ± 0 a	2 ± 0 a	4,18 ± 2,70 b	16 ± 0 b	3,20 ± 2,69 b	3 ± 0 a	6 ± 0 a
D3	2 ± 0 a	2 ± 0 a	6,04 ± 3,15 b	16 ± 0 b	2,53 ± 3,15 b	4,20 ± 3,09 b	6 ± 0 a
D4	2 ± 0 a	2 ± 0 a	6,93 ± 3,35 b	16 ± 0 b	2,67 ± 3,35 b	5,80 ± 4,89 b	6 ± 0 a

SA – secreção apócrina; ESF – esferocristais ; PMC – perda de material citoplasmático; PBE – perda de borda em escova; ECL – eliminação de células para o lúmen; PNCR – perda de ninhos de células regenerativas; PIC – picnose.

Dados seguidos por letras iguais não apresentam diferença significativa (Teste post-hoc de Dun, $p < 0,05$).

Figura 23 – Fotomicrografias das estruturas do intestino médio de abelhas recém-emergidas expostas aos grupos experimentais. Coloração por hematoxilina e eosina. (a) controle - D1; (b) glifosato - D2; (c) imidacloprido - D3; (d) mistura - D4; (ce) célula eliminada; (cm) capa muscular protetora; (be) borda em escova; (ep) epitélio; (L) lúmen; (n) núcleo; (ncr) ninho de células regenerativa. A seta indica perda do material citoplasmático (Autoria própria).



6.5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, relatamos os efeitos do herbicida glifosato, do inseticida imidacloprido e da mistura em concentrações residuais dos agrotóxicos encontrados em ambientes agrícolas e analisamos a toxicidade crônica para a abelha *S. postica* durante seu desenvolvimento. As taxas de sobrevivência dos nossos bioensaios no grupo controle foi superior a 90%, e dentro do limite de mortalidade de $\leq 15\%$

estabelecido pelo protocolo OECD 237 (2013) para avaliação da toxicidade de agrotóxicos em larvas de abelha *A. mellifera*. Protocolo esse utilizado pelo IBAMA para avaliação de risco de agrotóxicos para polinizadores no Brasil.

Em nossos bioensaios, não observamos diferenças significativas de mortalidade em relação ao controle para os grupos experimentais com o glifosato (D2 - 10%) e a mistura (D4 - 13%). Em estudo realizado com concentrações semelhantes à nossa em relação ao glifosato (0,8 mg/L), também não foram observadas diferenças na sobrevivência das larvas de *A. mellifera*, no desenvolvimento larval, pupal e total, mas apresentou efeito subletal, diminuição do peso larval (DAI et al., 2018). Já em abelhas adultas das espécies *A. mellifera* e *Hypotrigona ruspollii*, quando expostas ao ingrediente ativo após a pulverização do produto, causou mortalidade das abelhas, demonstrando assim a importância de restringir a pulverização nos horários de visitação das abelhas nas culturas (ABRAHAM et al., 2018).

Encontramos evidências que a taxa de mortalidade das abelhas ao longo do bioensaio foi significativamente comprometida após a ingestão do imidacloprido (D3) em doses residuais de campo em relação ao controle ($p < 0,05$), chegando a 30% das abelhas. Isso pode ser um indicativo de prejuízo para a sobrevivência da colônia exposta a esse agrotóxico a longo prazo. Estudo realizado com larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, mostrou que a taxa de sobrevivência acima de 50% só foi possível em doses de inseticida inferiores a 0,0056 μg de i.a./abelha (TOMÉ et al., 2012), corroborando com nossos resultados. Em abelhas solitárias *Osmia lignaria* e *Megachile rotundata* a exposição crônica ao imidacloprido teve efeito na longevidade das abelhas, velocidade de desenvolvimento e massa corporal que pode ter consequências fisiológicas e ecológicas consideráveis para as abelhas e as interações planta-polinizador (ANDERSON e HARMON-THREATT, 2019). Também foi relatado por Silva et al. (2016) que mesmo não provocando a morte imediata de *S. postica*, em doses subletais do imidacloprido pode levar a alterações comportamentais que comprometem o funcionamento da colônia, como a capacidade de reconhecimento de uma fonte de alimento, de deslocamento e de orientação.

A exposição crônica de abelhas expostas a dose simultânea de campo do imidacloprido e do glifosato pode não apresentar taxas significativas de mortalidade, porém podem ter efeitos adversos sobre diferentes aspectos do comportamento das

abelhas, afetando negativamente sua capacidade de aprendizagem olfativa comprometendo a coleta do alimento (MENGONI GOÑALONS et al., 2018; THOMPSON et al., 2014).

Além dos efeitos letais, avaliamos a variação corporal e observamos nos grupos experimentais com o ingrediente ativo glifosato e a mistura, medidas da DI e LC significativamente menores que os demais grupos. Se esses indivíduos puderem atingir a idade de forrageio, tendo em vista o tamanho do seu corpo e a diminuição das medidas provocadas pelo consumo do herbicida durante a fase larval, é possível que essas assimetrias resultem em desajustes na capacidade de voo das abelhas, na aerodinâmica e até mesmo incapacitá-las para o voo (BALBUENA et al., 2015; VALDOVINOS-NUÑES et al., 2009). Além disso, esses efeitos negativos podem reduzir a disponibilidade de alimento para a colônia que pode desencadear na sua perda (WOLF et al., 2014).

A relação entre o tamanho corporal das abelhas operárias, distância de forrageamento e aptidão/sobrevivência da colônia é complexa e envolve diversos fatores ambientais, como clima, sazonalidade, a quantidade de estoque de alimento e competição com outras colônias (CAMPBELL 2019; EVANS et al., 2017; VEIGA et al., 2013). O tamanho do corpo das abelhas, especialmente a DI, está correlacionado com a área de forrageamento, pois os músculos do voo estão inseridos nesta área (GREENLEAF et al., 2007). Indivíduos menores possuem menor alcance de forrageamento e indivíduos maiores podem explorar os recursos em áreas mais distantes (CAMPBELL et al., 2019). Veiga et al. (2013) ainda encontrou uma correlação significativa entre o vão intertegular, o tamanho das corbículas das operárias e os estoques de mel e pólen de *Melipona flavolineata*, quando a colônia estava com o estoque de alimento alto, a colônia investia em indivíduos com a DI maior e a corbícula menor, permitindo assim que esses indivíduos fossem capazes de explorar uma área maior, porém carregando menos pólen e quando o estoque na colônia era reduzido, o padrão se invertia, a colônia investia em indivíduos com corbículas maiores e a DI menor, permitindo que esse indivíduo coletasse mais pólen a cada voo, porém com menor alcance de forrageamento.

Assim, as malformações observadas no nosso estudo nos grupos experimentais D2 e D4 podem ser resultado do efeito tóxico dos ingredientes ativos. Isso pode ser decorrente de alterações na musculatura responsável pelo voo como

relatado por Dinh et al. (2016) e Dorneles et al. (2021) em abelhas expostas ao inseticida e ao acaricida clorpirifós. Por isso, tornam-se necessários mais estudos para avaliar o impacto dessas alterações na morfologia das abelhas recém-emergidas, pois as respostas em campo são mais complexas que as observadas em laboratório.

Durante o preparo das abelhas para a morfometria, observamos que as abelhas expostas ao glifosato estavam mais enrijecidas quando comparadas aos demais grupos experimentais. Isso pode indicar que o glifosato esteja interferindo na síntese da quitina. A quitina é um polissacarídeo nitrogenado que desempenha a função de estruturação do corpo da abelha e regula a perda da água (RUDALL, 1963) e da proteção contra de agrotóxicos e parasitas (CHARLIER et al., 2020). Provavelmente, durante a formação da cutícula, o herbicida pode estar aumentando a deposição de quitina nas abelhas, o que poderia provocar essa rigidez apresentada no nosso experimento.

Apesar de não haver trabalhos comprovando essa hipótese, sabe-se que alguns inseticidas são inibidores da síntese de quitina, que inibem a deposição de quitina na larva, gerando a falta de rigidez e dificultando a eliminação da cutícula velha e essas abelhas podem até sobreviver por algum tempo, porém eventualmente morrerão (MULLA, 1995; RETNAKARAN et al., 2003). Embora o modo de ação do glifosato em animais não seja suficientemente claro, sabe-se que este herbicida afeta o desenvolvimento de crustáceos, uma vez que aumenta a taxa metabólica, tornando o exoesqueleto mais fino e interferindo no nível de hormônios envolvidos no ciclo de mudas (FANTÓN et al., 2020, TRESNAKOVA et al., 2022), como encontrado por Banaee et al. (2019) onde a exposição causou o amolecimento e afrouxamento do exoesqueleto em caranguejos.

Outro parâmetro avaliado foi a contagem de hemócitos presente na hemolinfa das abelhas. Durante o período larval até o quinto instar, não observamos efeitos significativamente diferentes na concentração dos hemócitos totais quando comparados com o controle (D1) e nem nos demais grupos. Já as abelhas recém-emergidas apresentaram efeitos significativos nos grupos expostos ao imidacloprido e à mistura comparados ao controle. Existem trabalhos que também apresentaram alterações na quantidade de hemócitos em abelhas expostas a agrotóxicos e patógenos, como os experimentos realizados por Brandt et al. (2016). Abelhas adultas *A. mellifera* foram expostas a ação de três inseticidas neonicotinoides (imidacloprido,

tiacloprido e clotianidina) com doses de campo e em todos os casos foi observada uma redução na concentração de hemócitos, alterações a resposta de encapsulamento e a atividade antimicrobiana. Em contrapartida, experimentos realizados com a *M. quadrifasciata*, a contagem de hemócitos totais não foi alterada após a exposição do imidacloprido, porém a contagem diferencial de hemócitos houve redução do granulócitos (glóbulos brancos) e aumento dos pró-hemócitos (células-tronco; RAVAIANO et al., 2018).

A contagem dos hemócitos nos fornece uma medida indireta da imunocompetência celular basal (AL AUX et al., 2009). Os hemócitos fazem parte da defesa imunológica celular dos insetos, pois são responsáveis pela fagocitose, encapsulamento de patógenos e do fechamento de feridas (AL AUX et al., 2012; BRANDT et al., 2016). O número de hemócitos alterado após a exposição aos agrotóxicos pode resultar em falhas na defesa imunológica e aumento na suscetibilidade das abelhas a patógenos. Assim, mais estudos são necessários para entender o mecanismo de defesa das abelhas.

Notamos também que o número de hemócitos variou dentro do mesmo grupo tanto para larvas (0 a 30.000) como para abelhas emergidas (0 a 29.333). Isso pode ter ocorrido devido à dificuldade na extração do material, sua manipulação precisa ser minuciosa para evitar danos aos tecidos e consequente perda do material. No caso do nosso experimento, foi necessário ainda fazer um pool de duas larvas e um pool de 3 abelhas para conseguir obter a quantidade mínima de 5 μ L de hemolinfa, dificuldades essas também apontadas por outros autores na literatura (ANNOSCIA et al., 2018; MCAFEE et al., 2017; RAMSEY et al., 2019).

As análises histológicas revelaram os efeitos subletais dos dois ingredientes ativos glifosato e imidacloprido e da mistura no intestino médio das abelhas *S. postica* recém-emergidas. A perda da borda em escova nos grupos expostos com os agrotóxicos (D2, D3 e D4), pode acarretar em problemas nas células epiteliais e dificultar a absorção de nutrientes, uma vez que a borda em escova aumenta a superfície de contato das vilosidades e protege contra choques mecânicos (SERRÃO e CRUZ-LANDIM, 1995). Também observamos a perda de material citoplasmático, indicando que o epitélio do intestino está sofrendo danos causados pela exposição. Os quais dificilmente serão revertidos e podem causar alterações no funcionamento do órgão (GRELLA et al., 2019). Não observamos ocorrências de núcleos com

picnose, o que pode indicar que provavelmente não está ocorrendo mortes celulares nas células digestivas do intestino médio de *S. postica* expostas aos grupos experimentais (CARNEIRO et al., 2022).

Já a ausência de secreção apócrina e esferocristais no intestino médio em todos os grupos, incluindo o controle, indica a manutenção de padrão que pode ser explicado pela idade das abelhas. *S. postica* foi alimentada com os grupos experimentais durante o período larval, período o qual o alimento permanece no intestino médio, pois a passagem entre o ventrículo e o intestino posterior está fechado. Quando a larva cessa a alimentação na metade do último estágio larval (~5º instar) ocorre a defecação (~7º instar) e a partir desse momento elas não se alimentam até sua emergência, quando o intestino passa por uma reorganização tecidual durante a metamorfose (CRUZ-LANDIM, 2009). Fato esse, que pode explicar a ausência de secreção apócrina e esferocristais no intestino médio das abelhas recém-emergidas, pois a medida em que o contato com a substância tóxica decai, o equilíbrio osmótico é reestabelecido e a excreção de esferocristais também decai (GRELLA et al., 2019).

Outro dano encontrado, foi a eliminação de células do epitélio para o lúmen nos grupos expostos aos agrotóxicos (D2, D3 e D4), o que pode estar relacionado com a ingestão, pois são essas as células que possuem maior contato com os agrotóxicos (CAETANO et al., 1994). Essa eliminação de células pode ocorrer porque as células não exercem mais sua função de forma adequada (CACCIA et al., 2019; MIOTELO et al., 2022). No entanto, este dano pode ser reversível, pois as células são rapidamente substituídas por novas, produzidas nos ninhos regenerativos, assumindo o lugar das células eliminadas (GRELLA et al., 2019). Esse efeito também foi encontrado por Miotelo et al. (2022) com concentração subletal do tiametoxam para *M. scutellaris*.

Porém, em nossos resultados também observamos alterações significativas nos ninhos de células regenerativas no grupo exposto ao imidacloprido e à mistura. Essas alterações são consideradas mais graves (GRELLA et al., 2019), pois os ninhos de células regenerativas são responsáveis por reestruturar o epitélio, quando necessário, substituem os dois tipos de células (digestivas e endócrinas). Assim, podem afetar o funcionamento do órgão e causar problemas irreversíveis na digestão, absorção dos nutrientes e produção do hormônio (CRUZ-LANDIM, 2009; MARTINS et al., 2006). Efeito também observado em *P. helleri* exposta ao inseticida fipronil,

onde foram encontrados ninhos regenerativos desorganizados, indicando uma possível diminuição da capacidade de autorrenovação no intestino médio (FARDER-GOMES et al., 2021).

6.6. CONCLUSÃO

A partir de evidências aqui apresentadas, conclui-se que:

- Doses realísticas de campo interferem na sobrevivência das abelhas quando expostas ao imidacloprido, sugerindo um alerta para sua utilização.
- A mistura não tem efeito sinérgico e nem aditivo na mortalidade das abelhas, mas apresenta efeitos subletais.
- Os parâmetros morfométricos apontam para possíveis efeitos subletais a longo prazo em abelhas expostas ao glifosato e à mistura.
- Não foram evidenciadas alterações no número total de hemócitos circulantes na hemolinfa das larvas de 5º instar expostas aos tratamentos.
- O sistema imune das abelhas recém-emergidas foi afetado pela exposição à mistura e ao imidacloprido.
- Os danos causados pelos ingredientes ativos de forma isolada e combinada sugerem comprometimento no funcionamento do sistema digestório.

6.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALAUX, C.; KEMPER, N.; KRETZSCHMAR, A.; LE CONTE, Y. Brain, physiological and behavioral modulation induced by immune stimulation in honeybees (*Apis mellifera*): a potential mediator of social immunity? *Brain Behav. Immun.*, v. 26, p. 1057-1060, 2012.

ALMASRI, H.; TAVARES, D. A.; PIOZ, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; COUSIN, M.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P. Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 203, p. 111013, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111013>.

ALMEIDA, C. H. S.; HADDI, K.; TOLEDO, P. F. S.; REZENDE, S. M.; SANTANA, W. C.; AND GUEDES, R. N. C.; NEWLAND, P. L.; OLIVEIRA, E. E. Sublethal agrochemical exposures can alter honey bees' and Neotropical stingless bees' color preferences, respiration rates, and locomotory responses. **Science of The Total Environment**, v. 779, p. 146432, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146432>.

ALVARENGA, A. S.; SILVEIRA, F. A.; JÚNIOR, J. E. DOS S.; NOVAIS, S. M. A.; QUESADA, M.; NEVES, F. S. Vegetation composition and structure determine wild bee communities in a tropical dry forest. **Journal of Insect Conservation**, v. 24, p. 487-498, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10841-020-00231-5>.

AMARAL, I. M. R.; NETO, J. F. M.; PEREIRA, G. B.; FRANCO, M. B.; BELETTI, M. E., WARWICK, E., KERR, A. M. B., UEIRA-VIEIRA, C. Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis, **Micron**, v. 41, n. 2, p. 123-129, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.10.003>.

ANDERSON, N. L.; HARMON-THREATT, A. N. Chronic contact with realistic soil concentrations of imidacloprid affects the mass, immature development speed, and adult longevity of solitary bees. **Scientific Reports**, v. 9, p. 3724, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40031-9>.

ANNOSCIA, D.; Brown, S. P.; DI PRISCO, G., DE PAOLI, E.; DEL FABBRO, S.; FRIZZERA, D.; ZANNI, V.; GALBRAITH, D. A.; CAPRIO, E.; GROZINGER, C. M.; PENNACCHIO, F.; NAZZI, F. Haemolymph removal by Varroa mite destabilizes the dynamical interaction between immune effectors and virus in bees, as predicted by Volterra's model. **Proceedings. Biological sciences**, [s. l.], v. 286, n. 1901, p. 1-9, 2019.

BALBUENA, M. S.; TISON, L.; HAHN, M. L.; GREGGERS, U.; MENZEL, R.; FARINA, W. M. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 2799–2805. 2015. <https://doi.org/10.1242/jeb.117291>.

BANAEE, M.; AKHLAGHI, M.; SOLTANIAN, S.; GHOLAMHOSSEINI, A.; HEIDARIEH, H.; FEREDOUNI, M. S. Acute exposure to chlorpyrifos and glyphosate induces changes in hemolymph biochemical parameters in the crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 222, p. 145-155, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.05.003>.

BERRIDGE, M. J.; OSCHMANN, J. L. A structural basis for fluid secretion by Malpighian tubules. **Tissue Cell**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 247-272, 1969.

BEZERRA, J. L. de S., NETO, R. de C. A.; LUNZ, A. M. P.; de ARAÚJO, J. M., de A. C. S. Produção de mudas de açaizeiro (*Euterpe oleracea*) em resposta a diferentes fontes e doses de potássio. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO, v.17 n.33; p. 360, 2020.

BLOT, N., VEILLAT, L., ROUZÉ, R., DELATTE, H. Glyphosate, but not its metabolite AMPA, alters the honeybee gut microbiota. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0215466, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215466>.

BPBES/REBIPP, 2019. Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. Wolowski, M.; Agostini, K.; Rech, A. R.; Varassin, I. G.; Maués, M.; Freitas, L.; Carneiro, L. T.; Bueno, R. de O.; Consolaro, H.; Carneiro, L.; Saraiva, A. M.; Silva, C. I. da.; Padgurschi, M. C. G. (Org.). 1ª edição, São Carlos, SP: Editora Cubo. 184 páginas. <http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>.

BRANDT, A.; GORENFLO, A.; SIEDE, R.; MEIXNER, M.; BÜCHLER, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.), **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 40-47, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>.

BRITO, P., ELIAS, M., SILVA-NETO, C. et al. The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. **Environ Sci Pollut Res**, v. 27, p. 38654–38661, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08530-9>.

BUENO, A. de A.; MOTTA-JUNIOR, J. C. Food habits of two syntopic canids, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), in southeastern Brazil. **Revista Chilena de Historia Natural**, [s. l.] v. 77, n. 1, p. 5-14, 2004.

BUTOLO, N. P.; AZEVEDO, P.; ALENCAR, L. D. de; DOMINGUES, C. E. C.; MIOTELO, L.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. A high quality method for hemolymph collection from honeybee larvae. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 6, 2020.

CACCIA, S.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTI, G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. **Cell Tissue Res**, v. 377, p. 505-525, 2019. <https://doi.org/doi:10.1007/s00441-019-03076-w>.

CAETANO, F. H.; TORRES, JR. A. H.; CAMARGO-MATHIAS, A. M. I.; TOMAKE, E. M. Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). **Cytobios**, Cambridge, v. 80, p. 235-242, 1994.

CAMPBELL, A. J.; GOMES, R. L. C.; DA SILVA, K. C.; CONTRERA, F. A. L. Temporal variation in homing ability of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona* aff. *Postica* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Apidologie**, v. 50, p. 720–732, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00682-z>.

CAMPBELL, A. J.; LICHTENBERG, E. M.; CARVALHEIRO, L. G.; MENEZES, C.; BORGES, R. C.; COELHO, B. W. T.; FREITAS, M. A. B.; GIANNINI, T. C.; LEÃO, K. L.; DE OLIVEIRA, F. F.; SILVA, T. S. F.; MAUÉS, M. M. High bee functional diversity buffers crop pollination services against Amazon deforestation, **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 326, p. 107777, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2021.107777>.

CARNEIRO, L. S., MARTINEZ, L. C., DE OLIVEIRA, A. H., et al. Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers, **Science of The Total Environment**, v. 815, p. 152847, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152847>.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. **Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 99-117, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>.

CATAE, A. F., ROAT, T. C., PRATAVIEIRA, M. et al. Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 109–121, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1874-4>.

CHAM, K. DE O.; REBELO, R. M.; OLIVEIRA, R. DE P.; FERRO, A. A.; VIANA-SILVA, F. E. DE C.; BORGES, L. DE O.; SARETTO, C. O. S. D.; TONELLI, C. A. M.; MACEDO, T.C. Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília: Ibama/Diqua, 114 p., 2020.

CHARLIER, N.; DESOIL, M.; GOSSUIN, Y.; GILLIS P.; GALEZ, B. Imagem por Ressonância Paramagnética Eletrônica de Melanina em Mel de Abelha. **Cell Biochem Biophys**, 78 , 123-126. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12013-020-00903-8>.

CRUZ-LANDIM, C. da. Abelhas: morfologia e função de sistemas. 1 ed. São Paulo: Ed. UNESP; 2009.

DAI, P.; YAN, Z.; MA, S.; YANG, Y.; WANG, Q.; HOU, C.; WU, Y.; LIY, Y.; DAIO, Q. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 7786–7793, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02212>.

DINH, K. V.; JANSSENS, L.; THERRY, L.; BERVOETS, L.; BONTE, D.; STOKS R. Delayed effects of chlorpyrifos across metamorphosis on dispersal-related traits in a poleward moving damselfly, **Environ. Pollut.**, v. 218, p. 634-643, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.047>.

Diniz-Filho, J. A. F.; Malaspina, O., 1995. Evolution and population structure of Africanized honey bees in Brazil: evidence from spatial analysis of morphometric data. **Evolution**, v. 49, p. 1172-1179. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1995.tb04444.x>.

DORIGO, A. S.; SOARES-LIMA, H. M.; GALASCHI-TEIXEIRA, J. S.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. *In vitro* larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLOS ONE**, v. 14, p. e0223027, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213109>.

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

ELLIS, J. D.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, p. 134-136, 2010. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.30>.

EVANS, L. J; SMITH, K. E.; RAINE, N. E. Fast learning in free-foraging bumble bees is negatively correlated with lifetime resource collection. **Sci Rep.**, v. 7, p. 496, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00389-0>.

FANTÓN, N.; BACCHETTA, C.; ROSSI, A.; GUTIERREZ, M. F. Effects of a glyphosate-based herbicide on the development and biochemical biomarkers of the freshwater copepod *Notodiaptomus carteri* (Lowndes, 1934), **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 196, p. 110501, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110501>.

FARDER-GOMES, C. F., FERNANDES, K. M., BERNARDES, R. C., BASTOS, D. S. S., MARTINS, G. F., SERRÃO, J. E. 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.**, v. 774, p. 145679, 2021 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145679>.

FRANCOY, T. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A Morfometria Geométrica de Asas e a Identificação Automática de Espécies de Abelhas. **Oecologia Australis**, 14, 317-321. 2010. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.20>.

GOULSON, D., NICHOLLS, E., BOTÍAS, C., ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, p. 1–16, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>.

GREENLEAF, S. S.; WILLIAMS, N. M.; WINFREE, R.; KREMEN, C. Bee foraging ranges and their relationship to body size. **Oecologia**, v. 153, p. 589–596, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0752-9>.

GRELLA, T. C.; SOARES-LIMA, H. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach semi-quantitative analysis of morphological changes in bee. **Chemosphere**, [s. l.], v. 236, p. 1-5, 2019.

JUNQUEIRA, L. C. U; JUNQUEIRA, L., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Santos.

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

MARTINS, G. F., NEVES, C. A., CAMPOS, L. A., SERRÃO, J. E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron**, v. 37, n. 2, p. 161-8, 2006. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.micron.2005.07.003>.

MARZINZIG, B.; BRÜNJES, L.; BIAGIONIC, S.; BEHLING, H.; LINK, W.; WESTPHAL, C. Bee pollinators of faba bean (*Vicia faba* L.) differ in their foraging behaviour and pollination efficiency. Agriculture, **Ecosystems & Environment**, v. 264, p. 24-33, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.05.003>.

MCAFEE, A.; CHAN, Q.; EVANS, J.; FOSTER, L. J. A *Varroa destructor* protein atlas reveals molecular underpinnings of developmental transitions and sexual differentiation. **Mol Cell Proteomics**, [s. l.], v. 16, n; 12, p. 2125–2137, 2017.

MENGONI GOÑALONS, C.; FARINA, W. M. Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 1-8, 2018. <https://doi.org/10.1242/jeb.176644>.

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.

MIOTELO, L., DOS REIS, A. L. M., ROSA-FONTANA; A., PACHÚ, J. K. DA S.; MALAQUIAS, J. B.; MALASPINA, O., ROAT, T. C. A food-ingested sublethal concentration of thiamethoxam has harmful effects on the stingless bee *Melipona scutellaris*. **Chemosphere**, v. 288, p. 132461, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132461>.

MOTTA, E. V. S., MAK, M., DE JONG, T. K., POWELL, J. E., O'DONNELL, A., SUHR, K. J., RIDDINGTON, I. M., MORAN, N. A. Oral or Topical Exposure to Glyphosate in Herbicide Formulation Impacts the Gut Microbiota and Survival Rates of Honey Bees. **Appl Environ Microbiol.**, v. 86, n. 18, p.e01150-20, 2020 <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-20>.

MOTTA, E. V.; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 115, p. 10305–10310, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>.

MULLA, M. S., The future of insect growth regulators in vector control. **J. Mosq. Control Assoc.**, v. 11, p. 269 -273, 1995.

MUTO, N. A.; LEITE, R. O. de S.; PEREIRA, D. S.; ROGEZ, H. L. G.; VENTURIERI, G. C. Impact of the introduction of stingless bee colonies (*Scaptotrigona aff. postica*) on the productivity of acai (*Euterpe oleracea*), **Revista Verde**, Pombal, v. 15, n.3, p. 265-273, 2020. <https://doi.org/10.18378/rvads.v15i3.8404>.

NOGUEIRA-NETO, P. **A vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. 1. ed. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

ODANAKA, K. A.; REHAN, S. M. Impact indicators: Effects of land use management on functional trait and phylogenetic diversity of wild bees. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 286, p. 106663, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106663>.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure, n.237, jul. 2013.

OLIVEIRA, A. H., GONÇALVES, W. G., FERNANDES, K. M., BARCELLOS, M. S., SAMPAIO, W. M. S., LOPES, M. P., MARTINS, G. F., SERRÃO, J. E. Morphology and Morphometry of the Midgut in the Stingless Bee *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). **Insects**, v. 10, n. 3, p. 73, 2019. <https://doi.org/10.3390/insects10030073>.

PAL, E.; ALMASRI, H.; PARIS, L.; DIOGON, M.; PIOZ, M.; COUSIN, M.; SENÉ, D.; TCHAMITCHIAN, S.; TAVARES, D.A.; DELBAC, F.; BLOT, N.; BRUNET, J.-L.; BELZUNCES, L.P. Toxicity of the Pesticides Imidacloprid, Difenconazole and Glyphosate Alone and in Binary and Ternary Mixtures to Winter Honey Bees: Effects on Survival and Antioxidative Defenses. **Toxics**, v. 10, p. 104, 2022. <https://doi.org/10.3390/toxics10030104>.

PETTER, F. A, SEGATE, D., PACHECO, L. P., ALMEIDA, F. A., ALCÂNTARA NETO, F. Incompatibilidade física de misturas entre herbicidas e inseticidas. **Planta Daninha**, v. 30, p. 449-457, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582012000200025>.

PIGGOTT, J. J.; TOWNSEND, C. R.; MATTHAEI, C. D. Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. **Ecol. Evol.**, 5, 1538–1547. 2015. <https://doi.org/10.1002/ece3.1465>.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. DE M.; LOPES, M. T. DO R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, É. W., 2016. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51, 422-442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>.

PPDB, Pesticides Properties Database, 2020. A to Z List of Pesticide Active Ingredients. URL: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm>. Accessed at Novemver 09, 2022.

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

RAMSEY, S. D., OCHOA, R., BAUCHAN, G., GULBRONSON, C., MOWERY, J. D., COHEN, A. et al. *Varroa destructor* feeds primarily on honeybee fat body tissue and not hemolymph. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 116, n. 5, p. 1792- 1801, 2019.

RAVAIANO, S. V.; BARBOSA, W. F.; TOMÉ, H. V. V.; de OLIVEIRA CAMPOS, L. A.; MARTINS, G. F. Acute and oral exposure to imidacloprid does not affect the number of circulating hemocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* post immune challenge. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 152, p. 24-28, 2018.

RETNAKARAN, A.; KRELL, P.; FENG. Q.; ARIF, B. Ecdysone agonists: mechanism and importance in controlling insect pests of agriculture and forestry. **Arch Insect Biochem Physiol.**, v. 54, n. 4, p.187-99, 2003. <https://doi.org/1002/arch.10116>. PMID: [14635180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14635180/).

RICHARDSON, R. T., BALLINGER, M. N., QIAN, F. et al. Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. **Apidologie**, v. 49, p. 397–410, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0566-2>.

RODRIGUES, S. dos S., FIDALGO, A. de O., BARBEDO, C. J. Reproductive biology and production of seeds and seedlings of *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg. **Journal of Seed Science**, v. 39, p. 272–279, 2017. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n3174807>.

ROHLF, F. J.; MARCUS, L. F., A Revolution in Morphometrics, **Trends Ecol Evol**, v. 8, p. 129–132, 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90024-J](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90024-J).

ROSA-FONTANA, A. DE SOUZA; DORIGO, A. S.; FERREIRA, R. C. N.; MALASPINA, O. Placas de Acrílico para Criação *In Vitro* de Abelhas sem Ferrão, BR n. PI 102022001135-4. Depósito: 21 de Janeiro de 2022.

ROSA-FONTANA, A.; DORIGO, A. S.; GALASCHI-TEIXEIRA, J. S.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase? **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 265, part B, p. 1-9, 2020.

RUDALL, K. M., 1963 The Chitin/Protein Complexes of Insect Cuticles. *Advances in Insect Physiology*, 1, 257–313.

SANTOS, A. C.C.; CRISTALDO, P. F.; ARAÚJO, A. P. A.; MELO, C. R.; LIMA, A. P. S.; SANTANA, E. D. R.; OLIVEIRA, B. M. S. de; OLIVEIRA, J. W. S.; VIEIRA, J. S.; BLANK, A. F.; BACCI, L. *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera) in the target of neonicotinoids: A one-way ticket? Bioinsecticides can be an alternative. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 163, p. 28-36, 2018.

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>.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Gut Structures In Adult Workers Of Necrophorous Neotropical Stingless Bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Entomologia Generalis**, v. 19, n. 4, p. 261-265, 1995.

SGOLASTRA, F.; MEDRZYCKI, P., BORTOLOTTI, L.; MAINI, S.; PORRINI, C.; SIMON-DELISO, N.; BOSCH, J. Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. **Biol. Conserv.**, v. 241, p. 108356, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108356>.

SILVA, M. B.; NOCELLI, R. C. F.; SOARES, H. M.; MALASPINA, O. Efeitos do imidacloprido sobre o comportamento das abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 3, p. 21-28, 2016.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. et al. Structure and function of the intestine and Malpighian tubules: from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. Chapter in *Social Insects: Structure, Function and Behavior*. **Nova Science Publishers**, USA, p. 27, 2011.

SOUZA, D. A. DE S.; YI, W.; KAFTANOGLU, O.; DE JONG, D.; AMDAM, G. V., GONÇALVES, L. S.; FRANCOY, T. M. Morphometric Identification of Queens, Workers and Intermediates in *In Vitro* Reared Honey Bees (*Apis mellifera*), **Plos One**, 10, 1-14, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123663>.

THOMPSON, H. M.; LEVINE, S.L.; DOERING, J.; NORMAN, S.; MANSON, P.; SUTTON, P.; VON MÉREY, G. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. **Integr Environ Assess Manag.**, v. 10, p. 463-70, 2014. <https://doi.org/10.1002/ieam.1529>.

TOFILSKI, A. Using geometric morphometrics and standard morphometry to discriminate three honeybee subspecies. **Apidologie.**, v. 39, p. 558 – 563, 2008. <https://doi.org/10.1051/apido:2008037>.

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

TOMIZAWA, M.; LEE, D. L.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 45, p. 247–268, 2005.

TRESNAKOVA, N.; KUBEC, J.; STARA, A.; ZUSKOVA, E.; FAGGIO, C.; KOUBA, A.; VELISEK, J. Chronic Toxicity of Primary Metabolites of Chloroacetamide and Glyphosate to Early Life Stages of Marbled Crayfish *Procambarus virginalis*. **Biology.**, v. 11, n. 6, p. 9272022. <https://doi.org/10.3390/biology11060927>.

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). **Journal of economic entomology**, v. 102, p. 1737-1742, 2009. <https://doi.org/10.1603/029.102.0502>.

VEIGA, J. C.; MENEZES, C.; VENTURIERI, G. C.; CONTRERA, F. A. L. The bigger, the smaller: relationship between body size and food stores in the stingless bee *Melipona flavolineata*. **Apidologie**, v. 44, p. 324–333, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0183-4>.

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, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00814-w>.

WEISNER, O.; FRISCHE, T.; LIEBMANN, L.; REEMTSMA, T.; ROß-NICKOLL, M.; SCHÄFER, R. B.; SCHOLZ-STARKE, B.; VORMEIER, P.; KNILLMANN, S.; LIESS, M. *Risk from pesticide mixtures – The gap between risk assessment and reality*. **Science of The Total Environment**, v. 796, p. 149017, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149017>.

Willians, C. S. Conserving Europe's bees: why all the buzz? **Trends in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 309–310, 1995. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(00\)89115-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(00)89115-6).

WOLF, S.; MCMAHON, D. P.; LIM, K. S.; PULL, C. D.; CLARK, S. J.; PAXTON, R. J.; OSBORNE, J.L. So Near and Yet So Far: Harmonic Radar Reveals Reduced Homing Ability of Nosema Infected Honeybees. **PLoS ONE**, v. 9, p. e103989, 2014. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0103989>.

XIAO, J.; HE, Q.; LIU, Q.; WANG, Z.; YIN, F.; CHAI, Y.; YANG, Q.; JIANG, X.; LIAO, M.; YU, L.; JIANG, W.; CAO, H., Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment, **Science of The Total Environment**, v. 805, p. 1-10, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150292>.

ZATTARA, E. E.; AIZEN, M. A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness, **One Earth**, v. 4, p. 114-123, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>.

7. CONCLUSÃO GERAL

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

Não foi possível estabelecer um método adequado para realização do teste de toxicidade *in vivo* com agrotóxicos para abelhas sem ferrão devido à alta eficiência do comportamento higiênico da abelha *S. postica* e da proliferação do fungo no discos de cria em incubadora.

Os efeitos crônicos adversos do glifosato podem afetar o tamanho dos indivíduos e o funcionamento do intestino. Já o imidacloprido compromete a sobrevivência das abelhas, o sistema imunológico das abelhas adultas e o sistema digestório. E, por último, a mistura dos agrotóxicos, não causou a somas dos efeitos dos ingredientes, mas apresentou efeitos subletais no tamanho do indivíduo, no sistema imunológico e no sistema digestório.

APÊNDICES

Apêndice 1. Análise da taxa de mortalidade

shapiro-wilk normality test

data: dados\$morte
W = 0.40092, p-value < 2.2e-16

Kruskal-wallis rank sum test

data: morte by tratamento
Kruskal-wallis chi-squared = 7.4375, df = 3, p-value = 0.05919

```
> dunn_test(morte~tratamento, data = dados)
# A tibble: 6 x 9
  .y. group1 group2  n1  n2 statistic      p  p.adj p.adj.signif
* <chr> <chr> <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 morte t1    t2     30  30    1.89  0.0586  0.293 ns
2 morte t1    t3     30  30    2.65  0.00811 0.0487 *
3 morte t1    t4     30  30    1.51  0.130   0.521 ns
4 morte t2    t3     30  30    0.756 0.449   0.899 ns
5 morte t2    t4     30  30   -0.378 0.705   0.899 ns
6 morte t3    t4     30  30   -1.13  0.257   0.770 ns
```

Apêndice 2. Análise da distância intertegrar

shapiro-wilk normality test

data: dados\$distancia
W = 0.92515, p-value = 0.001244

Kruskal-wallis rank sum test

data: distancia by tratamento
Kruskal-wallis chi-squared = 17.589, df = 3, p-value
= 0.0005346

```
> dunn_test(distancia~tratamento, data = dados)
# A tibble: 6 x 9
  .y.      group1 group2  n1  n2 statistic      p  p.adj
* <chr> <chr> <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl>
1 distanc~ t1    t2     15  15    3.66  2.48e-4 0.00149
2 distanc~ t1    t3     15  15    1.83  6.73e-2 0.266
3 distanc~ t1    t4     15  15    3.50  4.70e-4 0.00235
4 distanc~ t2    t3     15  15   -1.83  6.65e-2 0.266
5 distanc~ t2    t4     15  15   -0.167 8.67e-1 0.867
6 distanc~ t3    t4     15  15    1.67  9.54e-2 0.266
# ... with 1 more variable: p.adj.signif <chr>
```

Apêndice 3. Análise da largura da cabeça

```
shapiro-wilk normality test

data: dados1$distancia
W = 0.95228, p-value = 0.01995

> kruskal.test(distancia~tratamento, data = dados1)

Kruskal-wallis rank sum test

data: distancia by tratamento
Kruskal-wallis chi-squared = 23.058, df = 3, p-value = 3.928e-05

> dunn.test(distancia~tratamento, data = dados1)
# A tibble: 6 x 9
  .y.      group1 group2   n1   n2 statistic      p    p.adj p.adj.signif
* <chr>   <chr>   <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 distancia t1     t2     15    15    3.59 0.000336 0.00168 **
2 distancia t1     t3     15    15    1.25 0.210    0.419 ns
3 distancia t1     t4     15    15    4.17 0.0000303 0.000182 ***
4 distancia t2     t3     15    15   -2.33 0.0197   0.0592 ns
5 distancia t2     t4     15    15    0.585 0.558   0.558 ns
6 distancia t3     t4     15    15    2.92 0.00354 0.0141 *
```

Apêndice 4. Análise do número de hemócitos circulantes na hemolinfa das larvas

```
shapiro-wilk normality test

data: dados2$Hemocito
W = 0.90721, p-value = 3.23e-09

> kruskal.test(Hemocito~Dieta, data = dados2)

Kruskal-wallis rank sum test

data: Hemocito by Dieta
Kruskal-wallis chi-squared = 6.189, df = 3, p-value = 0.1028

>
> # Teste Post-hoc - teste Dum com ajuste do valor de p
>
> dunn.test(Hemocito~Dieta, data = dados2)
# A tibble: 6 x 9
  .y.      group1 group2   n1   n2 statistic      p    p.adj p.adj.signif
* <chr>   <chr>   <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 Hemocito D1     D2     45    45    1.05 0.293   0.878 ns
2 Hemocito D1     D3     45    45    2.44 0.0147 0.0884 ns
3 Hemocito D1     D4     45    45    0.795 0.427   0.878 ns
4 Hemocito D2     D3     45    45    1.39 0.166   0.662 ns
5 Hemocito D2     D4     45    45   -0.257 0.797   0.878 ns
6 Hemocito D3     D4     45    45   -1.64 0.100   0.501 ns
```

Apêndice 5. Análise do número de hemócitos circulantes na hemolinfa das abelhas recém-emergidas

```
> shapiro.test(dados2$Hemocito)

      Shapiro-wilk normality test

data:  dados2$Hemocito
W = 0.81843, p-value = 1.062e-13

      Kruskal-wallis rank sum test

data:  Hemocito by Dieta
Kruskal-wallis chi-squared = 35.343, df = 3, p-value = 1.031e-07

>
> # Teste Post-hoc - teste Dum com ajuste do valor de p
>
> dunn_test(Hemocito-Dieta, data = dados2)
# A tibble: 6 × 9
  .y.      group1 group2   n1   n2 statistic      p      p.adj p.adj.signif
* <chr>   <chr>   <chr> <int> <int>   <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 Hemocito D1      D2      45   45    -1.45 0.147  0.294      ns
2 Hemocito D1      D3      45   45     2.50 0.0125 0.0374     *
3 Hemocito D1      D4      45   45     3.94 0.0000803 0.000391   ***
4 Hemocito D2      D3      45   45     3.95 0.0000783 0.000391   ***
5 Hemocito D2      D4      45   45     5.39 0.0000000688 0.000000413 ****
6 Hemocito D3      D4      45   45     1.44 0.149  0.294      ns
```

Apêndice 6. Análise do intestino

- Perda do material citoplasmático

```
> summarySE(dadosT, measurevar = "VRESP", groupvars = c("Grupo", "Dia") )
      Grupo Dia  N   VRESP      sd      se      ci
1   Controle  1  45 0.000000 0.000000 0.0000000 0.0000000
2   Glifosato  2  45 4.177778 2.69080 0.4011208 0.8084058
3 Imidacloprido  3  45 6.044444 3.14755 0.4692090 0.9456287
4   Mistura   4  45 6.933333 3.34664 0.4988877 1.0054420
```

- Aumento de células eliminadas

```
> summarySE(dadosT, measurevar = "VRESP", groupvars = c("Grupo", "Dia") )
      Grupo Dia  N   VRESP      sd      se      ci
1   Controle  1  45 0.000000 0.000000 0.0000000 0.0000000
2   Glifosato  2  45 3.200000 0.9908674 0.1477098 0.2976895
3 Imidacloprido  3  45 2.533333 1.5608855 0.2326831 0.4689419
4   Mistura   4  45 2.666667 1.2060454 0.1797866 0.3623361
```

- Perda dos ninhos de células regenerativas

```
> summarySE(dadosT, measurevar = "VRESP", groupvars = c("Grupo", "Dia") )
      Grupo Dia  N VRESP      sd      se      ci
1  Controle  1 45   3.0 0.000000 0.0000000 0.0000000
2  Glifosato  2 45   3.0 0.000000 0.0000000 0.0000000
3 Imidacloprido  3 45   4.2 3.093982 0.4612237 0.9295352
4   Mistura   4 45   5.8 4.887833 0.7286351 1.4684675
```

- Borda em escova

```
> summarySE(dadosT, measurevar = "VRESP", groupvars = c("Grupo", "Dia") )
      Grupo Dia  N VRESP      sd      se      ci
1  Controle  1 45  15.2 1.61808 0.2412091 0.4861249
2  Glifosato  2 45  16.0 0.00000 0.0000000 0.0000000
3 Imidacloprido  3 45  16.0 0.00000 0.0000000 0.0000000
4   Mistura   4 45  16.0 0.00000 0.0000000 0.0000000
```