

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS *CAMPUS* SOROCABA
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS (CCHB)
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA (DBIO)

LETÍCIA FERREIRA SARAIVA

**MONITORAMENTO DE NIDIFICAÇÃO DE *Tetrapedia diversipes*
PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE
FÊMEAS EXPOSTAS AO ÓLEO DE NIM**

SOROCABA

2025

Letícia Ferreira Saraiva

**MONITORAMENTO DE NIDIFICAÇÃO DE *Tetrapedia diversipes* PARA
AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE FÊMEAS
EXPOSTAS AO ÓLEO DE NIM**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para a obtenção do
título de Bacharel em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina
Mathias da Silva

Sorocaba

2025

Folha de aprovação


Letícia Ferreira Saraiva

"MONITORAMENTO DE NIDIFICAÇÃO DE *Tetrapedia diversipes* PARA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE FÊMEAS EXPOSTAS AO ÓLEO DE NIM".

Trabalho de Conclusão de Curso


Universidade Federal de São Carlos – campus Sorocaba

Sorocaba, 27 de Janeiro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **ELTON LUIZ SCUDELER**
Data: 27/01/2025 16:24:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientador

Prof. Dr. Elton Luiz Scudeler

Documento assinado digitalmente
 **MARIA VIRGINIA URSO GUIMARAES**
Data: 02/02/2025 23:28:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro 1

Profa. Dra. Maria Virginia Urso-Guimarães

Documento assinado digitalmente
 **KYL ASSAF**
Data: 25/07/2025 15:16:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro 2

Profa. Dra. Kyl Assaf

DEDICATÓRIA

*Dedico o presente trabalho aos meus pais,
Mariene e Fernando, que sempre mantiveram
os pés no chão para que eu pudesse voar.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Fernando Magalhães Saraiva e Mariene Ferreira da Silva, pelo apoio e amor incondicional desde meu nascimento, pelo carinho, cuidado e interesse pelos meus sonhos. Obrigada por priorizarem minha educação e meus valores, por fazerem dos meus sonhos seus também. Sem vocês eu jamais teria conseguido.

Ao meu irmão, Fernando Magalhães Saraiva Júnior (Nunu), por acreditar em mim para além das minhas próprias inseguranças. Obrigada por cuidar de mim como sua caçula.

Aos meus primos Jonathan, Juliane e Jéssica, e tia Deta, por não saírem do meu lado mesmo de longe, e por terem me dado os presentes mais especiais do mundo: Henrique, Sophia e Ravi. Tudo que faço é por vocês também.

Ao meu amor, parceiro e companheiro, Gustavo, por me incentivar e me inspirar diariamente. Obrigada por me lembrar da importância do que faço e não me deixar desistir. A admiração e amor que sinto por você são imensuráveis.

À minha orientadora e Professora, Elaine Cristina Mathias da Silva, por ter acreditado em mim desde o primeiro segundo, por ter acompanhado minha trajetória de amadurecimento científico e por ter me guiado com tanto profissionalismo, amizade e carinho, além de sua admirável sabedoria. Tenho a senhora em mente quando penso no tipo de profissional que desejo me tornar.

Ao meu co-orientador, Prof. Elton Luiz Scudeler, por toda ajuda e orientação desde o início, e por corrigir pacientemente todas as vezes que escrevi “O Azadiractina” ao invés de “A Azadiractina” (precisei conferir novamente antes de escrever).

Aos meus colegas do NuPECA, por fazer nosso laboratório um lugar tão leve e especial de se trabalhar. Agradeço em especial a Doutora Rafaela Tadei que esteve comigo desde os primeiros dias deste projeto, me ensinando tanto com uma didática e profissionalismo fenomenais, e por todas nossas idas ao SAF. Você é inspiradora!

À Universidade Federal de São Carlos pela infraestrutura e instalações que permitiram a realização desse projeto, bem como aos funcionários da limpeza e manutenção das dependências do *campus* que sempre me proporcionaram um lugar limpo e digno para estudar e trabalhar.

Ao LaDIVE e à Profa. Letícia Souto pela utilização do micrótomo e fotomicroscópio.

Ao Grupo de Pesquisa sobre Hidrologia em Ecossistemas Florestais (Hidrolef) pela disponibilização das observações meteorológicas (FAPESP 2019/12890-0), especialmente à Profa. Kelly.

À FAPESP e ao CNPq pelo financiamento de partes dessa pesquisa.

Ao Carlos e à Ana Paula por embarcarem no sonho de uma menina de 17 anos, sem ao menos conhecê-la, e terem a ajudado a dar o primeiro passo.

A todos que colaboraram com essa pesquisa direta ou indiretamente, meu muito obrigada!

“É justo que muito custe aquilo que muito vale.”

(Santa Teresa D’Ávila)

RESUMO

A abelha solitária *Tetrapedia diversipes* Klug (1810) (Hymenoptera: Apidae) nidifica em cavidades pré-existentes e coleta recursos florais para construção dos ninhos e alimentação do adulto e da cria. Durante o forrageamento, essa abelha nativa pode entrar em contato com diferentes substâncias aplicadas nas plantas. Com o objetivo de avaliar os efeitos do bioinseticida óleo de nim (*Azadirachta indica*) sobre as células corpo gorduroso e comportamento de fêmeas adultas de *T. diversipes* em duas concentrações da formulação comercial de FitoNeem, ninhos artificiais (*trap nests*) foram coletados no período de novembro de 2023 a março de 2024 e manejados em laboratório. Os grupos experimentais dos bioensaios de exposição por contato foram: grupo controle do solvente (acetona); menor concentração (FN-I) e maior concentração (FN-II) do Fitoneem aplicadas em campo. A análise comportamental de todos os indivíduos ocorreu em diferentes momentos após a exposição: tempo zero, 24, 48, 72 e 96 horas. As lâminas histológicas contendo o corpo gorduroso de 3 fêmeas para cada grupo experimental foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), Sudan Black, Xilidine Ponceau e PAS + azul de bromofenol. Nos indivíduos expostos a Azadiractina (FN-I e FN-II), notou-se um padrão morfológico distinto dos trofócitos em relação ao grupo controle, com vacuolização mais pronunciada no citoplasma e granulações nucleares mais evidentes, enquanto que os enócitos apresentaram grumos de compactação cromatínica nuclear, vacúolos atípicos no seu citoplasma e núcleo irregular. Após 96 horas de exposição, notou-se diferença estatisticamente significativa nas médias dos indivíduos para velocidade e distância percorrida, sendo menor nos indivíduos expostos a maior concentração de óleo de nim. Houve a tentativa de quebra de diapausa em virtude de baixo número amostral de fêmeas. O monitoramento mensal da nidificação sugere que a sua taxa no período de estudo, bem como as taxas de mortalidade e parasitismo, também tenha influenciado a baixa emergência de indivíduos de *T. diversipes*, além das condições climáticas. A análise global dos resultados obtidos indica a tendência de que a Azadiractina causa efeitos subletais em *T. diversipes* ao induzir efeitos histopatológicos em células do corpo gorduroso, o que pode afetar as diversas funções que o órgão desempenha, bem como sobre o comportamento de locomoção dos indivíduos.

Palavras-chave: abelha nativa, bioinseticida, ecotoxicologia, *vídeo tracking*.

ABSTRACT

The solitary bee *Tetrapedia diversipes* Klug (1810) (Hymenoptera: Apidae) nests in pre-existing cavities and collects floral resources to build nests and feed the adult and offspring. During foraging, this native bee may come into contact with different substances applied to plants. In order to evaluate the effects of the bioinsecticide neem oil (*Azadirachta indica*) on the fat body cells and behavior of adult females of *T. diversipes* in two concentrations of the commercial formulation FitoNeem, artificial nests (trap nests) were collected from November 2023 to March 2024 and managed in the laboratory. The experimental groups of the contact exposure bioassays were: solvent control group (acetone); lowest concentration (FN-I) and highest concentration (FN-II) of Fitoneem applied in the field. Behavioral analysis of all individuals occurred at different times after exposure: time zero, 24, 48, 72 and 96 hours. Histological slides containing the fat body of 3 females for each experimental group were stained with Hematoxylin and Eosin (HE), Sudan Black, Xylidine Ponceau and PAS + bromophenol blue. In individuals exposed to Azadirachtin (FN-I and FN-II), a distinct morphological pattern of trophocytes was observed in relation to the control group, with more pronounced vacuolization in the cytoplasm and more evident nuclear granulations, while oenocytes presented clumps of nuclear chromatin compaction, atypical vacuoles in their cytoplasm and irregular nucleus. After 96 hours of exposure, a statistically significant difference was observed in the means of the individuals for speed and distance traveled, being lower in individuals exposed to higher concentrations of neem oil. There was an attempt to break diapause due to the low sample number of females. Monthly monitoring of nesting suggests that its rate during the study period, as well as mortality and parasitism rates, also influenced the low emergence of *T. diversipes* individuals, in addition to climatic conditions. The overall analysis of the results obtained indicates the tendency for Azadirachtin to cause sublethal effects in *T. diversipes* by inducing histopathological effects in fat body cells, which may affect the various functions that the organ performs, as well as the locomotion behavior of individuals.

Keywords: native bee, bioinsecticide, ecotoxicology, video tracking.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 Utilização de pesticidas e a polinização por abelhas	14
3.2 <i>Tetrapedia diversipes</i> – uma breve caracterização	16
3.3 O Corpo Gorduroso	17
3.4 O nim indiano (<i>Azadirachta indica</i>)	19
4 METODOLOGIA	22
4.1 Obtenção dos indivíduos em campo	22
4.2 Manutenção dos indivíduos em laboratório	23
4.2.1 Quebra de diapausa	26
4.3 Grupos experimentais	29
4.4 Preparo das soluções	29
4.5 Exposição tópica	32
4.6 Processamento histológico e análise do corpo gorduroso	33
5 RESULTADOS	35
5.1 Obtenção dos indivíduos	35
5.2 Monitoramento dos ninhos coletados e quebra de diapausa	35
5.3 Efeitos da Azadiractina sobre o corpo gorduroso de <i>T. diversipes</i>	39
5.4 Efeitos da Azadiractina sobre o comportamento de <i>T. diversipes</i>	44
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A transformação na base técnica da produção agrícola nacional desde a Revolução Verde garantiu a posição do Brasil como um dos maiores produtores mundiais de *commodities* agrícolas, entretanto vem provocando impactos ambientais negativos de diferentes magnitudes (Matos; Pessôa, 2011; Silva, 1996; SINDIVEG, 2015; Teixeira, 2005). Além das mudanças climáticas intensificadas pela emissão de gases de efeito estufa e consumo de combustíveis fósseis, o uso indiscriminado de agrotóxicos na produção de alimentos também acarreta na instabilidade e deterioração dos recursos naturais, pontos diretamente ligados ao modelo agrário prevalecente no país (Rigotto; Vasconcelos; Rocha, 2014; Teixeira, 2005).

Fatores como a rápida dissipação no solo e nas águas e o alto poder de escoamento culminam na acumulação dos agrotóxicos em segmentos bióticos e abióticos do ecossistema, levando à contaminação de corpos d'água e espécies não alvo, o que provém impactos significativos sobre organismos aquáticos, comunidades tradicionais, trabalhadores rurais, insetos benéficos e componentes da cobertura vegetal (Egger *et al.*, 2021; Lopes; Albuquerque, 2018; Ribas; Matsumura, 2009). Dessa forma, torna-se emergente a redução desses impactos citados por meio da implementação de modelos de produção que permitam que o país alcance um desenvolvimento sustentável ao passo que conserva seu patrimônio ambiental (Pellegrino; Assad; Marin, 2007).

É frente a este cenário que o cultivo orgânico se demonstra como uma alternativa viável pelo fato de não utilizar produtos químicos sintéticos, resguardar o ambiente de grandes impactos e produzir alimentos sem agrotóxicos (Roel, 2002). Com um ambiente mais estável, tal técnica de produção propõe manter a presença de polinizadores e de inimigos naturais de insetos fitófagos, de forma que as interações ecológicas e sinergismos entre os componentes biológicos gerem fertilidade do solo, produtividade e proteção dos agroecossistemas (Altieri, 2001; Ormond *et al.*, 2002; Roel, 2002). Assim, a proteção do serviço ecossistêmico de polinização é essencial para a manutenção e aumento da produtividade agrícola (De Groot *et al.*, 2002).

As abelhas são responsáveis por cerca de 73% da polinização de espécies vegetais cultivadas no mundo e apresentam grande eficiência na atividade por possuírem adaptações às estruturas florais complexas (FAO, 2004; Nogueira-Couto *et al.*, 1990). Além disso, os indivíduos beneficiam-se do néctar e pólen das flores por

meio do forrageamento, servindo estes como base da alimentação de adultos, larvas e pupas, uma vez que são compostos por carboidratos, vitaminas e água, e proteínas, lipídios, minerais e vitaminas, respectivamente (Barbosa *et al.*, Ribeiro; Rêgo; Machado, 2008).

Adicionalmente, as abelhas nativas têm alta eficiência na polinização de cultivos convencionais e orgânicos (Bawa, 1990; Heithaus, 1979; Santos, 2010), sendo responsáveis pela polinização de 40% a 90% das espécies arbóreas, e participam da polinização de cultura de frutos de interesse comercial. Portanto, a conservação da biodiversidade brasileira de polinizadores reflete na preservação de matas nativas e manutenção da produção de alimentos (Costa-Maia; Lino-Lourenço; Toledo, 2010; Kerr *et al.*, 1996).

Segundo Beringer *et al.* (2019), a perda do serviço ecossistêmico de polinização devido ao uso indiscriminado de agrotóxicos é um risco iminente que afeta as abelhas. Tal fator é levado em consideração pelo cultivo orgânico ao fazer uso de métodos alternativos para o controle de espécies que ameacem a produção, sendo um deles os inseticidas naturais à base de plantas, chamados de biopesticidas (Roel, 2001). Apesar de mais amigáveis aos diferentes componentes do ecossistema, deve-se reiterar que os biopesticidas apresentam eficiência no controle de diferentes insetos e microrganismos nocivos a partir de métodos de fácil aplicação e aquisição (Xavier *et al.*, 2018).

Levando em consideração os efeitos já descritos de óleos essenciais sobre o sistema nervoso de insetos pragas, como alterações no comportamento de voo ou forrageamento, em adição aos efeitos sobre o crescimento, alimentação e reprodução, há a preocupação se esses compostos possam estar agindo negativamente também sob espécies de inseto benéfico não alvo (Copping; Menn; 2000; Pavela; Benelli, 2016).

Sendo o óleo de nim um bioinseticida obtido a partir das sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) (Meliaceae) e amplamente utilizado em cultivos orgânicos e hortas domésticas, sabe-se que este apresenta o ingrediente ativo Azadiractina capaz de gerar efeitos letais e subletais sobre espécies de inseto não alvo. No entanto, estudos dos efeitos da Azadiractina sobre a abelha nativa solitária *Tetrapedia diversipes* ainda não foram realizados, apesar de sua grande importância enquanto inseto neotropical polinizador, com ampla distribuição e bionomia bem

conhecida, além de ser uma espécie bem avaliada em estudos ecotoxicológicos (Assis *et al.*, 2022; Camilo, 2005).

Busca-se, assim, avaliar os efeitos do óleo de nim sobre a *Tetrapedia diversipes* de forma de forma a contribuir com avanços na área de ecotoxicologia de abelhas nativas e para a conservação da biodiversidade brasileira ao compreender os potenciais riscos da Azadiractina para insetos polinizadores de culturas orgânicas de interesse nacional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do bioinseticida conhecido como óleo de nim sobre as células do corpo gorduroso de fêmeas adultas da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* em duas concentrações de FitoNeem (princípio ativo Azadiractina) aplicadas no campo, após 96 horas de exposição aguda tópica, em relação aos indivíduos do grupo controle não expostos e mantidos sob as mesmas condições.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o monitoramento mensal da nidificação de *T. diversipes* no campo para coleta e monitoramento da emergência das abelhas adultas fêmeas em laboratório e seu uso nos bioensaios toxicológicos;

- Realizar a análise histopatológica nas células do corpo gorduroso, com base na incidência de cada alteração morfológica causada pelo princípio ativo Azadiractina, em comparação com abelhas não expostas ao óleo de nim;

- Realizar a análise histoquímica dos trofócitos do corpo gorduroso, especificamente a frequência dos grânulos de proteínas, lipídios e distribuição de carboidratos no citoplasma dos trofócitos, nos grupos expostos e não exposto ao óleo de nim;

- Analisar o comportamento das abelhas, por meio de *vídeo tracking*, em diferentes momentos após a exposição ao nim, para avaliação dos diferentes parâmetros de movimento ao longo do tempo pós-exposição, nos grupos expostos e não exposto ao óleo de nim, de forma a compreender os efeitos temporais deste óleo sobre os padrões comportamentais.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Utilização de pesticidas e a polinização por abelhas

A agricultura brasileira, marcada pelo processo de modernização da Revolução Verde desde a década de 1950, tem demonstrado, cada vez mais, a utilização de métodos mecanizados que corroboram com novos modelos de produção no setor agrário (Teixeira, 2005). Com a possibilidade de ampliar áreas cultivadas e a escala de produção, a constante busca por uma maior rentabilidade é acompanhada por equipamentos e insumos, visando gerar excedentes exportáveis (Teixeira, 2005).

Tal modernização configura-se como a transformação na base técnica da produção agropecuária com foco em culturas de interesse internacional, tendendo a fortalecer monoculturas e garantindo a posição do Brasil como um dos maiores produtores mundiais de commodities agrícolas (Silva, 1996; Matos, Pessôa, 2011; Sindiveg, 2015). No entanto, a priorização do desenvolvimento a qualquer custo a partir da expansão da fronteira agrícola provoca impactos ambientais negativos de diferentes magnitudes, seja a partir da emissão de gases de efeito estufa advinda das queimadas que caracterizam o sistema de derrubada e queima, seja pelo desmatamento e consumo de combustíveis fósseis, demonstrando a instabilidade e deterioração dos recursos naturais causados pelo modelo agrícola atual e prevalente no país (Pellegrino, Assad, Marin, 2007).

Para além das mudanças climáticas, faz-se necessário citar os impactos ambientais causados pelo uso indiscriminado de insumos químicos na produção agrícola, como os agrotóxicos, que também se acentuou a partir da década de 1960 e atualmente faz do Brasil o maior consumidor dessas substâncias do mundo (Rigotto, Vasconcelos, Rocha, 2014; Teixeira, 2005). Características como a rápida dissipação no solo e nas águas e alto poder de escoamento garantem a potencialidade dos agrotóxicos a contaminar reservatórios de água, rios, bacias fluviais, impactando diretamente os organismos vivos aquáticos, comunidades tradicionais próximas às áreas de cultivo e trabalhadores rurais (Egger *et al.*, 2021; Lopes, Albuquerque, 2018). A preocupação também é alarmante acerca da contaminação de espécies não-alvo, como peixes destinados ao consumo humano, insetos e componentes da cobertura vegetal, advinda da capacidade de acumulação dos agrotóxicos nos segmentos bióticos e abióticos do ecossistema (Ribas, Matsumura, 2009).

Compreende-se, portanto, a imprescindibilidade da redução dos impactos acima citados por meio da implementação de modelos de produção agrícola eficientes, que permitam que o país alcance um desenvolvimento sustentável ao passo que conserva seu patrimônio ambiental (Pellegrino, Assad, Marin, 2007).

É frente a este cenário que o cultivo orgânico na agricultura ecológica se demonstra como uma alternativa mais sustentável e amigável aos diferentes componentes da biodiversidade e às mudanças climáticas, uma vez que bane o uso de produtos químicos, resguarda o ambiente de grandes impactos, produz alimentos sem contaminantes e diminui os custos de produção, sem que haja grandes alterações do solo (Roel, 2002). Por meio de um ambiente mais estável, um dos objetivos do cultivo orgânico é manter a presença de polinizadores e de inimigos naturais de insetos fitófagos, de forma que as interações ecológicas e sinergismos entre os componentes biológicos criem a fertilidade do solo, a produtividade e a proteção da cultura. (Altieri, 2001; Ormond *et al.*, 2002; Roel, 2002).

A polinização é imprescindível para a reprodução de espécies vegetais tanto em cultivos convencionais quanto em cultivos orgânicos, visto que se trata do processo de transferência do grão de pólen para o estigma nas Angiospermas por meio de atividades de animais vertebrados e invertebrados, bem como por fatores abióticos (Andrade, Romeiro, 2009; Lima, Rocha, 2012). Uma vez diretamente ligada à produção de sementes, grãos, frutas e óleos, a polinização demonstra-se como um serviço ecossistêmico essencial para a manutenção e produtividade agrícola (De Groot *et al.*, 2002).

Quanto aos insetos polinizadores, estima-se que as abelhas sejam responsáveis por 73% da polinização de espécies vegetais cultivadas no mundo e apresentam maior eficiência na atividade por possuírem adaptações às estruturas florais complexas (Fao, 2004; Nogueira-Couto *et al.*, 1990). Em decorrência de sua atividade de forrageamento, as diferentes espécies de abelhas beneficiam-se do néctar e pólen advindos das flores, servindo estes como base da alimentação de indivíduos adultos, larvas e pupas, e tornando possível a reprodução de diversas espécies vegetais como consequência (Barbosa *et al.*, 2017).

A *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758), a abelha africanizada, é uma espécie exótica criada em larga escala por fornecer grandes quantidades de mel e destaca-se entre as espécies utilizadas nas monoculturas mundiais para a produção de frutos (Costa-Maia, Lino-Lourenço, Toledo, 2010; D'avila, Marchini, 2005). Apesar da imensurável

importância econômica e grande contribuição na atividade de polinização apresentadas pelas abelhas melíferas, as abelhas nativas também possuem relevância na prestação deste serviço ecossistêmico, caracterizando-se como os visitantes florais mais abundantes nas regiões tropicais e demonstrando eficiência em cultivos convencionais ou orgânicos, bem como em culturas de estufa e abertas (Heithaus, 1979; Bawa, 1990; Santos, 2010).

Assim, as abelhas nativas são responsáveis pela polinização de 40% a 90% das espécies arbóreas, polinizando também a cultura de diversos frutos de interesse comercial (tomate, maracujá-amarelo, caju e acerola), características notáveis que refletem a importância da conservação da biodiversidade brasileira para a preservação de matas nativas e manutenção da produção de alimentos consumidos em todo o território nacional. (Costa-Maia, Lino-Lourenço, Toledo, 2010; Kerr *et al.*, 1996).

3.2 *Tetrapedia diversipes* – uma breve caracterização

Do número de espécies registradas para abelhas (mais de 20.000 atualmente), sabe-se que pelo menos 85% delas são classificadas como solitárias, uma das três categorias de comportamento (Batra, 1984). Nesse modo de vida, cada fêmea realiza o processo de nidificação de forma independente, desde a construção do ninho até a postura de células de cria, e morre antes da emergência da geração subsequente (Batra, 1984). É importante citar que as abelhas das famílias Apidae e Megachilidae são representativas em termos de grupos que constroem seus ninhos em cavidades pré-existentes (Marchi, 2008).

Dentro do grupo de abelhas solitárias na região Neotropical, as tribos Centridini, Tapinotaspidini e Tetrapediini evoluíram com um comportamento especializado de coleta de recursos florais traduzidos em adaptações morfológicas complexas, como cerdas simples ou ramificadas (escopas) nas pernas posteriores e/ou médias, mais acentuadas nas fêmeas, para coletar e transportar óleos florais produzidos por plantas das famílias Mapighiaceae, Scrophulariaceae, Krameriaceae, Solanaceae, Iridaceae e Orchidaceae (Alves-dos-Santos; Machado; Gaglianone, 2007; Cavalcante, 2016; Neff; Simpson, 1981; Schlindwein, 2004; Vogel, 1974). A efetividade de polinização por abelhas especializadas solitárias, em geral, demonstra-se como não substituível por abelhas generalistas, de forma que possuem um papel importante na manutenção

de espécies vegetais e se mostram até mais eficientes na polinização comparado à abelhas sociais em determinadas culturas (Cavalcante, 2016; Imperatriz-Fonseca *et al.*, 2005; Schilindwen, 2004).

A espécie nativa solitária *Tetrapedia diversipes* Klug (1810) (Hymenoptera: Apidae), tendo ampla distribuição e bionomia bem conhecida (Camillo, 2005), destaca-se enquanto visitante frequente de culturas de tomate, murici, morango e café, e é uma das espécies que conta com adaptações morfológicas nas pernas posteriores (escopa) para a coleta de recursos florais para além de pólen e néctar: as fêmeas do gênero fazem ninhos em cavidades pré-existentes, com revestimento e divisão das células feitos de uma mistura de areia e óleo (Alves-dos-Santos; Machado; Gaglianone, 2007). Assim, ao coletar seus recursos de plantas ruderais, torna-se alvo fácil de exposição por contato a partículas de pesticidas no ar ou na superfície de espécies vegetais (Assis *et al.*, 2022).

Demonstra-se, dessa forma, como uma espécie nativa que pode desempenhar um eficiente papel de bioindicador para o monitoramento ambiental devido ao seu comportamento de forrageamento, que faz da espécie sensível a efeitos de distúrbios ambientais (Menezes *et al.*, 2012).

3.3 O Corpo Gorduroso

O corpo gorduroso é um tecido que preenche a cavidade do corpo dos insetos e apresenta-se como um órgão de múltiplas funções, tendo destaque a de reserva energética e de sede principal do metabolismo intermediário, e é constituído, principalmente, por dois tipos celulares: trofócitos e enócitos (Cruz-Landim, 2009).

Os trofócitos são células de origem mesodérmica e são responsáveis pelo armazenamento de lipídios, proteínas e carboidratos sob a forma de glicogênio, bem como por sintetizar a maior parte das proteínas presentes na hemolinfa, o que facilita a troca de metabólitos (Cruz-Landim, 2009; Oliveira; Cruz-Landim, 2003). Quanto à sua morfologia, são células com grande núcleo irregular e estruturas de reserva no citoplasma (como grânulos ou 'gotas' de lipídio) e grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, bem como corpos vesiculares largos e vacúolos aparentes (Skowronek; Strachecka, 2021). Destacam-se nos processos de desintoxicação, excreção do organismo e síntese de vitelogenia, além do acúmulo de reservas especialmente nas larvas (Chapman, 2013; Keeley, 1985; Pan *et al.*, 1969).

Os enócitos, por sua vez, são células de origem ectodérmica dispersas no corpo gorduroso, entre os trofócitos, com contorno bem definido e capazes de ativamente absorver substâncias da hemolinfa em indivíduos adultos, bem como sintetizar carboidratos (Cruz-Landim, 2009; Skowronek; Strachecka, 2021). É importante citar que a proporção de células de trofócitos e enócitos varia de acordo com a fase da vida em que o inseto se encontra (Oliveira; Cruz-Landim, 2003. Santos, 2013).

A histofisiologia do corpo gorduroso pode ser influenciada por fatores como o ciclo de muda, estado nutricional e de desenvolvimento do inseto (Cotton; Anstee, 1991). Em abelhas, é mais desenvolvido em adultos jovens e em fêmeas, sendo encontrado em mais abundância no abdômen em todos os indivíduos adultos (Cruz-Landim, 2009). Em fêmeas das espécies de abelhas solitárias, como *Tetrapedia diversipes*, os trofócitos predominam sobre os enócitos no compartimento visceral, uma vez que sintetizam a vitelogenina, precursora da vitelina depositada nos ovócitos durante a vitelogênese, o que demonstra relação com o desenvolvimento de ovários (Cruz-Landim, 2009; Keeley, 1985; Pan *et al.*, 1969). Nota-se, assim, a diferença na composição celular do corpo gorduroso em abelhas solitárias a partir do sexo.

Em conjunto com as células do sistema imunitário e as células pericárdicas, o corpo gorduroso demonstra-se como um importante preditor de efeitos de agrotóxicos ao compor o Sistema Hepato Nefrocítico (HNS), ou primeira via de desintoxicação em nível celular nas abelhas, ativada quando em contato com um agente estressor para minimizar efeitos deletérios de compostos químicos no organismo (Abdalla; Domingues, 2015; Assis, 2022).

As partículas residuais de pesticidas podem chegar ao corpo gorduroso ao atravessar o exoesqueleto e chegar à hemolinfa durante a atividade de forrageamento. Os resíduos são levados ao vaso dorsal, órgão responsável pela promoção da circulação de hemolinfa no corpo dos insetos, após passar pelo Sistema Hepato Nefrocítico, onde há o contato direto com os trofócitos e enócitos (Abdalla; Domingues, 2015).

Dado o exposto, o corpo gorduroso demonstra-se, assim, como um órgão de alta relevância em estudos toxicológicos (Assis, 2022; Balsamo *et al.*, 2020; Cousin *et al.*, 2013; Abdalla; Domingues, 2015; Lycett *et al.*, 2006).

3.4 O nim indiano (*Azadirachta indica*)

O Nim ou Amargosa (*Azadirachta indica* A. Juss) é uma árvore pertencente à família Meliaceae, nativa de regiões áridas do sul asiático e cultivada em ampla escala nos Estados Unidos, Austrália, países da África e América Latina, principalmente pelo seu potencial uso medicinal, propriedades de repelente e bioinseticida (Neves; Oliveira; Nogueira, 2003).

Com um bom desenvolvimento em temperaturas acima de 20 °C e precipitação pluviométrica anual entre 400 e 800 mm, o nim é uma planta muito resistente e de crescimento rápido, podendo atingir até 25 m (Neves; Nogueira, 1996). Sendo uma árvore robusta, o potencial ecológico do nim consiste na utilização em larga de espécimes em programas de reflorestamento e recuperação de áreas degradadas, bem como enquanto componente arbóreo em sistemas agroflorestais, consorciado com sisal, amendoim, feijão, algodão, sorgo e mandioca (Martins, 2008; Neves, 2004; Neves; Nogueira, 1996). A madeira avermelhada, dura e resistente do tronco atrai interesse pelo grande potencial para fins energéticos e produção de carvão, e as folhas verde-escuras são utilizadas como pasta para o tratamento de doenças por erupções cutâneas e para evitar doenças periodonticas em pessoas na Ásia e África (Araújo *et al.*, 2000; Martins, 2008; Soares *et al.*, *sd.*).

Tratando do potencial uso medicinal do nim indiano, as características interessantes provêm, sobretudo, do extrato bruto ou óleo vegetal, que é o principal produto dessa espécie e apresenta compostos biologicamente ativos extraídos das folhas, caules e sementes, sendo a azadiractina o mais importante tetranortriterpenoide limonoide extraído das sementes, responsável pelas ações contra insetos (Neves, 2004; Martins, 2008; Mordue (Luntz); Nisbet, 2000).

A Azadiractina tornou-se importante no controle de espécies indesejadas em cultivos por seu largo espectro de ação e rápida biodegradação, sem que haja ação fitotóxica ou tóxica ao homem, bloqueando o desenvolvimento dos insetos (Martins, 2008; Benício; Neto; Sousa, 2009). De acordo com Neves e Nogueira (1996), os extratos de nim provocam distorções na metamorfose, efeitos antialimentar, inibição do crescimento, malformação, redução da fertilidade e mortalidade, principalmente em artrópodes que ingerem ou entram em contato com substratos tratados com o óleo (Neves; Nogueira, 1996).

Os efeitos primários anti-alimentares sobre os insetos são produzidos pela estimulação de quimiorreceptores nas partes bucais, juntamente com a interferência na percepção de fagoestimulantes por outros quimiorreceptores, enquanto os efeitos secundários sobre a alimentação, desenvolvimento e interrupção reprodutiva são causados diretamente nos tecidos somáticos e reprodutivos e indiretamente pela interrupção de processos endócrinos (Mordue (Luntz; Nisbet, 2000; Mordue (Luntz) *et al.*, 1998).

Assim, compreende-se que a Azadiractina é capaz de gerar efeitos letais e subletais sobre espécies de inseto não alvo a partir de alterações fisiológicas e comportamentais, reduzindo a alimentação e aumentando a mortalidade, além de induzir a ocorrência de ecdises anormais e tardias que afetam o crescimento durante o desenvolvimento (Gupta; Dikshit, 2010; Mordue-Luntz; Nisbet, 2000). Apesar disso, estudos sobre o efeito do óleo de nim em insetos não alvo ainda são escassos, o que dificulta avaliar o risco do composto para os insetos benéficos em cultivos orgânicos de modo a estabelecer concentrações seguras para o uso desse biopesticida.

Tendo como exemplo a espécie benéfica não alvo, o predador *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae), Scudeler *et al.* (2016) demonstraram que o óleo de nim apresentou efeitos citotóxicos sobre o intestino de indivíduos adultos após exposição oral no período larval, como alterações ultra estruturais nas células colunares (principais) e regenerativas. Em adição, alterações ultra estruturais sobre as fibras musculares viscerais, como a redução de miofilamentos e acúmulo de estruturas de membrana, bem como sinais de degeneração, foram demonstrados para indivíduos adultos de *Ceraeochrysa claveri* expostos a Azadiractina por meio de dieta contaminada durante o período larval, de modo que a camada de músculo visceral também é alvo indireto da ação do óleo de nim neste inseto benéfico (Scudeler *et al.*, 2017)

Em *Apis mellifera*, o efeito do óleo de nim foi observado quando aplicado sob colmeias para controle de *Varroa destructor*, de forma a resultar em mortalidade de 100% dos ovos e atraso no desenvolvimento larval em concentração de 21,1%, bem como o decréscimo da oviposição à concentração de 10,6% e morte de duas abelhas rainhas após uma aplicação a 5,3% (González-Gomez *et al.*, 2016).

Em abelhas não *Apis*, os únicos dois estudos concluídos são com abelha social sem ferrão. O efeito negativo do óleo de nim foi demonstrado sobre as rainhas de *Partamona helleri* (Friese, 1900) e resultou na redução das taxas de sobrevivência,

afetando o tempo de desenvolvimento e causando deformações no órgão reprodutivo (Bernardes *et al.*, 2018). Em outro estudo, larvas de operárias de *Melipona quadrifasciata* foram expostas à Azadiractina, resultando em pupas e adultos deformados (Barbosa *et al.*, 2015).

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção dos indivíduos em campo

Para a confecção dos ninhos artificiais (*trap nests*) alocados em abrigos (hotéis) previamente instalados no campo, utilizou-se tubos de cartolina branca com a extremidade do fundo fechada e com diâmetro de 6 mm, inseridos em 4 blocos de madeira Cambará, cada um medindo 21 cm x 14 cm x 7 cm (Camillo, 2005; Aguiar; Martins, 2002). Os blocos foram instalados em hotéis em fragmentos vegetacionais dentro da universidade e seu entorno imediato (sistema agroflorestal), em uma região de transição entre Mata Atlântica e Cerrado, com predominância de Floresta Tropical Sazonal Seca (Corrêa *et al.*, 2014).

As inspeções dos hotéis ocorreram mensalmente e, em cada uma delas, metade dos tubos nidificados foram coletados e conduzidos para o laboratório para monitoramento da emergência dos indivíduos nas condições *in vitro*, enquanto a outra metade permaneceu em campo para manutenção da população local. A manutenção de cada abrigo, para além da coleta dos tubos nidificados, também consistiu na limpeza de pólen e óleo acumulados nos blocos de madeira, bem como na remoção e controle de espécies indesejadas de parasitas (Figura 1).

Figura 1 - (A) Hotéis das abelhas com blocos de madeira Cambará e tubos de cartolina branca (ninhos artificiais ou *trap nests*). (B) Manutenção dos blocos e hotéis, coletando apenas metade dos tubos de cartolina e substituindo-os por novos.



Fonte: elaborado pela autora.

Indivíduos em atividade de voo em campo não foram coletados devido à incerteza quanto à idade, exposição a estressores diversos no campo e a alimentação, variáveis estas que poderiam comprometer a análise do corpo gorduroso, bem como a idade pode interferir na análise comportamental, devido aos estressores prévios que os indivíduos poderiam sofrer em campo e que comprometem variáveis como tempo de voo e tempo de locomoção ao caminhar.

4.2 Manutenção dos indivíduos em laboratório

Após a coleta e transporte ao laboratório, os ninhos ocupados com as células de cria foram individualmente acondicionados em tubos cilíndricos de acrílico (12 cm x 2,5 cm) individualmente etiquetados (Figura 2). Originalmente, os tubos acrílicos foram mantidos em estufa B.O.D com controle de umidade e ($60\% \pm 20\%$) e temperatura ($29 \pm 2^{\circ}\text{C}$), até a emergência dos adultos. Após a emergência, os indivíduos foram identificados e separados de acordo com o sexo (macho e fêmea) e individualmente alocados em potes para bioensaio contendo alimento *ad libitum* (solução 1:3 de açúcar demerara orgânico e água), sendo feito o controle da idade para o posterior bioensaio.

Figura 2 - (A) Tubos de acrílico individualmente etiquetados com ninhos artificiais (*trap nests*) acondicionados para manutenção da emergência dos indivíduos. (B) Indivíduos de *Tetrapedia diversipes* (seta) e *Centris analis* no mesmo tubo após emergência.

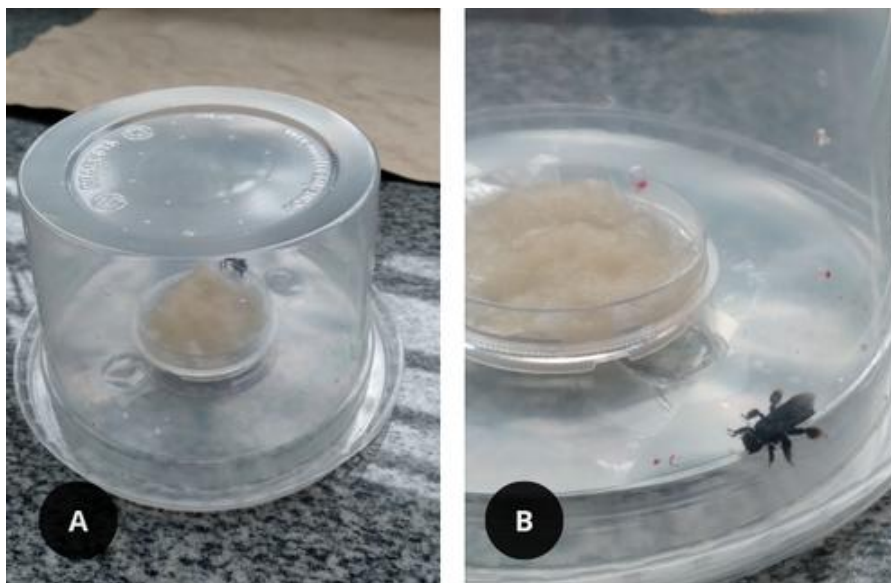


Fonte: elaborado pela autora.

Os ninhos em tubos acrílicos mantidos em estufa do tipo B.O.D foram monitorados diariamente para verificação de emergência e soltura de indivíduos de outras espécies que também nidificam nas mesmas cavidades pré-existentes, como é o caso da abelha solitária *Centris analis*, indivíduos *Coelioxys* sp. e outras abelhas da família Megachilidae, bem como vespas cleptoparasitas. Informações com relação ao local de coleta, data de coleta, data de emergência, espécie e uso final de cada indivíduo (soltura ou manutenção *in vitro*) foram coletadas e planilhadas. Dessa forma, tornou-se possível o controle de diversos parâmetros acerca dos indivíduos emergidos em laboratório, bem como a idade destes para utilização em bioensaios.

Após a emergência, as abelhas recém-emergidas foram acondicionadas em recipientes de plástico com furos para ventilação e contendo um recipiente com algodão encharcado em solução de xarope (1:3 açúcar-água) e mantidas em estufa incubadora do tipo B.O.D para aclimatação (Figura 3).

Figura 3 - (A) Recipiente plástico com furos para ventilação contendo recipiente com algodão encharcado em solução de alimento (xarope), de 1:3 açúcar-água. (B) Indivíduo de *Tetrapedia diversipes* em aclimatação no recipiente de bioensaio.



Fonte: elaborado pela autora.

No entanto, notou-se a baixa praticidade para trocar os alimentadores de algodão sem que fosse necessário anestésiar os indivíduos durante as 96 horas, assim como uma notável dificuldade no momento da transferência dos potes de bioensaio para as placas de Petri a cada 24 horas para o *video tracking*.

Assim, com o intuito de reduzir o estresse dos indivíduos pela constante abertura dos potes e evitar a crioanestesia sem necessidade (mantendo-a somente para o momento precedente da exposição e dissecação do órgão), optou-se por acondicionar os indivíduos após emergência em tubos Falcon de 15 mL, com microtubos (tipo Eppendorf) furados na extremidade, que serviram como alimentadores (Figura 4). Assim, a oferta *ad libitum* do alimento tornou-se mais efetiva e os indivíduos puderam ser transferidos para as placas de Petri com maior facilidade e menos estresse, direcionando a saída do tubo Falcon (onde coloca-se a placa de Petri) em direção à luz.

Figura 4 - (A) Novo recipiente para aclimação dos indivíduos, feito com tubo Falcon de 15 mL e microtubo (seta) na extremidade para oferta *ad libitum* do alimento. (B) Indivíduos de *Tetrapedia diversipes* em aclimação no novo recipiente.



Fonte: elaborado pela autora.

4.2.1 Quebra de diapausa

A queda da emergência de *Tetrapedia diversipes* nas condições de laboratório foi notória em momentos de transição de estação (verão-outono) e inverno de 2024, com agravante do panorama atípico climático enfrentado no mesmo ano (INMET, 2024), e a obtenção de indivíduos dentro dos requisitos previamente estabelecidos referente à idade e sexo das abelhas tornou-se um desafio. Assim, buscou-se implementar metodologias capazes de interromper o período da possível diapausa, comum da espécie frente às condições desfavoráveis ao desenvolvimento, como mudanças ambientais repentinas representadas por altas temperaturas ou quedas bruscas e longos períodos de seca ou chuvosos, aspectos meteorológicos registrados durante o ano de 2024 (INMET, 2024).

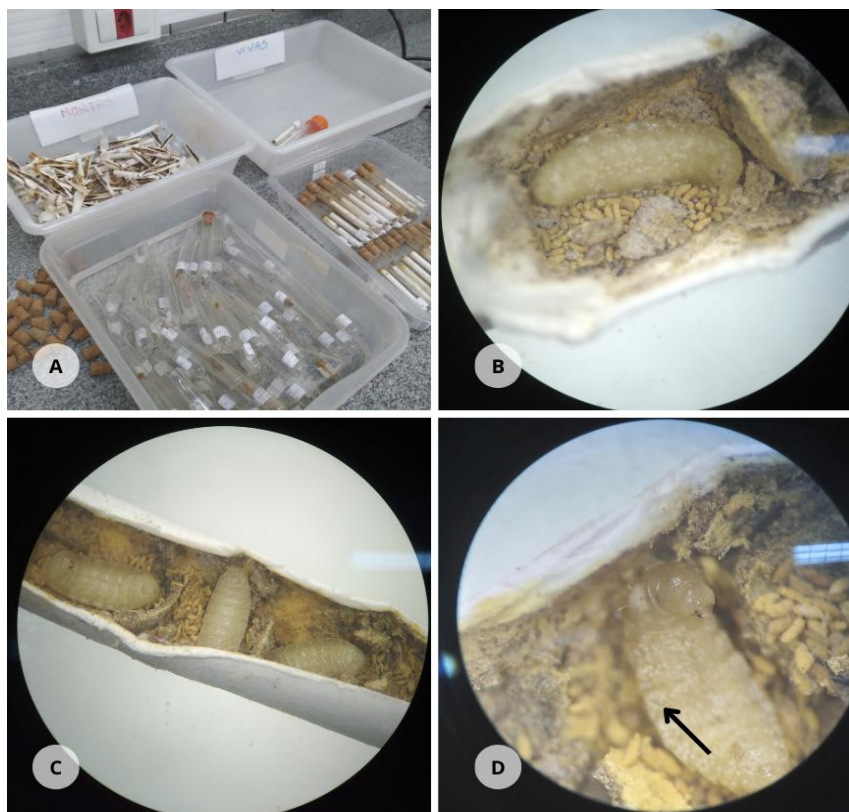
Para relacionar as taxas de emergência de *Tetrapedia diversipes* às condições ambientais de 2024 e compreender o possível 'gatilho' do comportamento de diapausa, obteve-se dados de registros diários referentes à amplitude térmica do período compreendido entre a primavera de 2023 e primavera de 2024 (especificamente de novembro de 2023 a setembro de 2024), a partir da Estação

Meteorológica Davis do *campus* Sorocaba da Universidade Federal de São Carlos, localizada próxima aos pontos de coleta. A média diária e mensal e desvio padrão dos registros foram calculados utilizando o software de análise estatística R.

Dada a quantidade de ninhos coletados entre setembro de 2023 a outubro de 2024 que ainda poderiam apresentar potencial emergência dos indivíduos, buscou-se realizar a verificação e checagem do estágio de desenvolvimento dos indivíduos dentro de cada célula de cria por meio da abertura dos *trap nests* previamente mantidos em estufa tipo B.O.D à temperatura de 29°C ($\pm 2^\circ$ C) e umidade de 60% (Figura 5). Com base na morfologia das larvas, pré-pupas, pupas ou indivíduos adultos, cada ninho poderia ter 3 destinos (Figura 6):

1. **Descarte:** no caso de ninhos que apresentaram larvas, pupas ou indivíduos adultos com aspecto seco, fungado, com formigas ou teia de aranha;
2. **Encaminhamento para o teste de diapausa:** no caso de ninhos que apresentaram larvas com aspecto saudável e presença de urócitos subtegumentares, visíveis ao estereomicroscópio, pupas em formação ou adultos próximos à emergência;
3. **Uso ou soltura:** no caso de indivíduos adultos que, no momento da abertura, saíram do ninho e podem ser usados nos bioensaios; ou indivíduos adultos de outras espécies (soltura).

Figura 5 - (A) Abertura de ninhos para verificação do estágio de desenvolvimento dos indivíduos e saúde das larvas. (B) Larva com a presença de urócitos e produtos amarelados do sistema digestório ao redor. (C) Disposição horizontal e vertical de larvas em potencial emergência. (D) Larva próxima ao fim do desenvolvimento larval, já com formação ocular e de aparato bucal, bem como a presença de urócitos (seta).

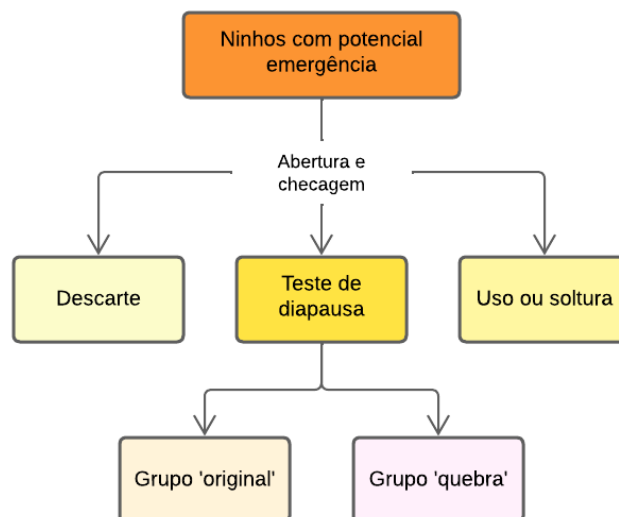


Fonte: elaborado pela autora.

Os ninhos restantes após abertura e verificação que continham larvas com aspecto saudável foram divididos igualmente em 2 grupos, a fim de testar a influência de fotoperíodo e a amplitude térmica na quebra da diapausa, como descrito por Sgolastra *et al.* (2012) para abelhas *Osmia* sp.:

- Grupo condição original: mantidos em estufa tipo B.O.D à temperatura de 29° ($\pm 2^\circ$ C) à 60% de umidade
- Grupo 'quebra' de diapausa: mantidos em outra estufa tipo B.O.D com fotoperíodo, à amplitude térmica de 10° (22° - 32°C) em variação de um ciclo (escuro/claro) de 12:12 horas, à 60% de umidade (Sgolastra *et al.*, 2012).

Figura 6 - Fluxograma representando a divisão de ninhos com potencial emergência para implementação da metodologia de interrupção do período de diapausa (grupo 'quebra' – com fotoperíodo e amplitude térmica) em comparação ao grupo 'original' (temperatura e umidade constante)



Fonte: elaborado pela autora.

4.3 Grupos experimentais

Os indivíduos identificados como fêmeas e na faixa etária de 1 a 3 dias foram utilizados para composição dos grupos experimentais: controle solvente (acetona) (CTL-A), FitoNeem-I (FN-I) na concentração mais baixa aplicada no campo e FitoNeem-II (FN-II) na concentração mais alta aplicada no campo, conforme a bula do fabricante. Os bioensaios de exposição aguda tópica ocorreram em blocos experimentais.

4.4 Preparo das soluções

Para a preparação das soluções de óleo de nim utilizadas para a exposição tópica dos indivíduos, foram selecionadas as concentrações mínima (FN-I) e máxima (FN-II) recomendadas e registradas para uso no campo em culturas agrícolas (MAPA) para o FitoNeem.

A concentração mínima recomendada é de 1,5 litros de FitoNeem diluídos em 400 litros de água, o que gera o valor de 3,75 mL para 1 litro de água. Logo, utilizou-se 0,1875 mL (= 187,5 microlitros) de FitoNeem para 50 mL de água na exposição

tópica dos indivíduos. Já para a concentração mais alta, tem-se que a concentração recomendada é de 3 litros de FitoNeem em 200 litros de água, obtendo-se 15 mL para 1 litro de água. Para a solução de 50 mL de água, aliquotou-se 0,75 mL de FitoNeem para a exposição dos indivíduos (Figura 7).

Figura 7 - Preparo das soluções utilizadas para os ensaios toxicológicos, aliquotando a quantidade necessária para cada uma das concentrações estabelecidas.



Fonte: elaborado pela autora.

Os cálculos realizados são demonstrados a seguir:

Mínimo: 1,5L de Fitoneem em 400 Litros de água

Máximo: 3,0L de Fitoneem em 200 Litros de água

Concentração do Óleo de Nim no Fitoneem = 850g/L

- Mínimo: 1,5L de Fitoneem em 400 Litros de água (0,00375 L/3,75mL em 1 Litro de água) = 3,19 g/L.

1L do Fitoneem _____ 850 g/L de óleo de Neem

$$0,00375L \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad X$$

$$X = 3,19 \text{ g/L}$$

- Máximo: 3,0L de Fitoneem em 200 Litros de água (0,015 L/15mL em 1 Litro de água) = 12,75 g/L

$$1L \text{ do Fitoneem } \underline{\hspace{2cm}} \quad 850 \text{ g/L de óleo de Neem}$$

$$0,015 L \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad X$$

$$X = 12,75 \text{ g/L}$$

No entanto, para os testes padronizados de exposição por contato em abelhas, é necessário usar um solvente orgânico ao invés de água para dissolver o princípio ativo de forma que este atravesse o tegumento do tórax do inseto. Dessa forma, utilizou-se a acetona para as diluições nos grupos CTL (que passou a ser CTL-A), FN-I e FN-II.

- Preparo das soluções para aplicação nos bioensaios

- Concentração mais baixa (FN-I):

$$3,75\text{mL do Fitoneem } \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000\text{mL}(=1\text{L}) \text{ de acetona}$$

$$X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 50\text{mL}$$

$$X = (50 \times 3,75\text{mL})/1000\text{mL}$$

$$X = 0,1875\text{mL} (= 187,5 \text{ microlitros})$$

- Concentração mais alta (FN-II):

$$15\text{mL do Fitoneem } \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000\text{mL}(=1\text{L}) \text{ de acetona}$$

$$X \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 50\text{mL}$$

$$X = (50 \times 15\text{mL})/1000\text{mL}$$

$$X = 0,75\text{mL} (= 750 \text{ microlitros})$$

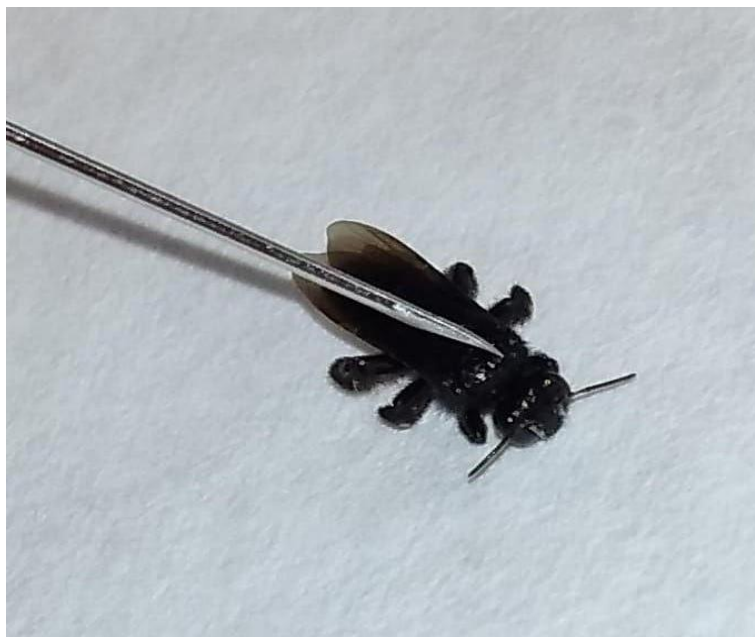
4.5 Exposição tópica

Os bioensaios foram conduzidos de acordo com os protocolos estabelecidos pela OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) para abelhas não *Apis* (nº 246, 2017), EFSA (*European Food Safety Authority, Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees*, 2013) e USEPA (*United States Environmental Protection Agency, Guidance for assessing pesticide risks to bees*, 2014), com adaptações para *T. diversipes* (Assis *et al.*, 2022).

Para a exposição tópica, as abelhas foram pesadas e anestesiadas por resfriamento individualmente a 4°C por 1 minuto. A deposição de 1 µL da solução sobre o tórax de cada abelha ocorreu com o auxílio de uma micropipeta de Hamilton (Figura 8), em todos os grupos experimentais (CTL-A, FN-I, FN-II).

Após a completa absorção da gota depositada no tórax, cada abelha foi transferida para uma placa de Petri para o monitoramento do comportamento inicial por meio de *vídeo tracking*. Somente após a filmagem dos indivíduos, cada abelha foi realocada de volta para seu respectivo pote de bioensaio e mantidas em estufa B.O.D.

Figura 8 – Indivíduo de *Tetrapedia diversipes* no momento da exposição à solução contendo o óleo de nim. Note 1µL da solução/acetona sendo depositada sobre o tórax com auxílio de uma micropipeta de Hamilton.



Fonte: elaborado pela autora.

As abelhas foram monitoradas a cada 24 horas por 4 dias consecutivos (96 horas após a exposição tópica).

4.6 Processamento histológico e análise do corpo gorduroso

Após 96 horas de exposição aguda por contato, os indivíduos (N=9) foram anestesiados por resfriamento (4°C) por 3 minutos e, em seguida, foram submetidos à dissecação sob estereomicroscópio para remoção do corpo gorduroso. Os órgãos dissecados foram fixados *overnight* em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (0,1 mol/L, pH 7,4) e desidratado em uma série crescente de etanol de baixa temperatura (4° C) (segundo o protocolo de Silva-Zacarin *et al.*, 2012).

Os órgãos foram incluídos em historesina de acordo com as instruções do fabricante (Leica Historesin Embedding Kit), em que para cada 15 mL de resina de embebição, utilizou-se 1 mL de *hardner*. Após a polimerização, os blocos de historesina foram colados blocos de madeira para serem submetidos à microtomia.

A microtomia consistiu na confecção de lâminas histológicas contendo 12 cortes de 3 micrômetros de espessura cada, em diferentes profundidades do órgão. Posteriormente, as lâminas contendo as secções histológicas do órgão foram submetidas à coloração por diferentes métodos para análise morfológica (Hematoxilina e Eosina) e histoquímica, sendo estes: Xylidine Ponceau para detecção de proteínas totais (VIDAL, 1970); Reação do P.A.S. com contracoloração de Azul de Bromofenol para detecção de polissacarídeos neutros (MCMANUS, 1946); Sudam Black para detecção de lipídios neutros (PEARSE, 1960).

A etapa de análise consistiu na avaliação de todos os cortes histológicos de cada lâmina, por indivíduo, em microscópio óptico de campo claro, de forma a definir o padrão morfológico e histoquímico do corpo gorduroso, bem como a análise comparativa do corpo gorduroso entre os indivíduos representantes de seu respectivo grupo experimental (CTL-A, FN-I e FN-II).

4.7 Análise comportamental

A análise de comportamento foi realizada com base no método de avaliação por *video tracking*. Para isso, montou-se uma arena de filmagem com uma caixa de isopor (33 cm x 23 cm x 27,3 cm), uma placa de acrílico para apoio e uma câmera fotográfica digital para gravação dos vídeos, apenas com a luminosidade natural do

ambiente. No fundo da caixa de isopor, dispôs-se uma folha de papel branco com a marcação exata da posição da placa de Petri, de forma que todos os indivíduos fossem filmados da mesma forma e no mesmo ângulo.

Cada indivíduo submetido ao bioensaio foi filmado individualmente por 10 minutos a cada 24 horas por 4 dias (imediatamente após a exposição (T0), e 24, 48, 72 e 96 horas após a exposição). Para a filmagem, as abelhas foram transferidas dos potes de bioensaio para placas de Petri, onde foram aclimatadas por 5 minutos antes do início das filmagens. Variáveis como velocidade e distância percorrida foram captadas pela filmagem para avaliação pelo software EthoVision, recurso pelo qual obteve-se os dados referentes aos aspectos previamente citados.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção dos indivíduos

Utilizando a metodologia de *trap nests* apresentada, obteve-se 15 indivíduos seguindo os requisitos pré-estabelecidos para a formação de blocos experimentais, sendo que 12 destes eram fêmeas, demonstrando que a confecção de ninhos em blocos de madeira é efetiva, sobretudo quando o controle da idade dos indivíduos é desejado.

A obtenção dos indivíduos para bioensaio ocorreu de 28 de novembro de 2023 a 25 de março de 2024, mês em que houve uma queda nas taxas de emergência, possivelmente devido à transição de estação (verão-outono) e ao panorama atípico climático, seguido pelo inverno de 2024. Após a data citada e com coletas acontecendo mensalmente (com exceção ao período de inverno), a obtenção de novos indivíduos não foi suficiente para contemplar os critérios necessários para formar um bloco experimental (fêmeas adultas na faixa etária de 1 a 3 dias de idade pós-emergência para compor os grupos CTL-A, FN-I e FN-II), de forma que $N = 9$.

5.2 Monitoramento dos ninhos coletados e quebra de diapausa

O monitoramento diário dos ninhos em tubos acrílicos mantidos em estufa do tipo B.O.D foi realizado no período de setembro de 2023 a dezembro de 2024, resultando em 555 indivíduos emergidos em laboratório, sendo divididos em: *Tetrapedia diversipes* (macho, fêmea e indivíduos não identificados), *Tetrapedia curvitaris* (macho, fêmea e indivíduos não identificados), *Centris analis* (macho, fêmea e indivíduos não identificados), abelhas da família Megachilidae e vespas cleptoparasitas não identificadas. A relação entre o número de indivíduos para cada grupo citado é demonstrada a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantidade de indivíduos emergidos em laboratório no período separada por espécie e sexo (NI = não identificado).

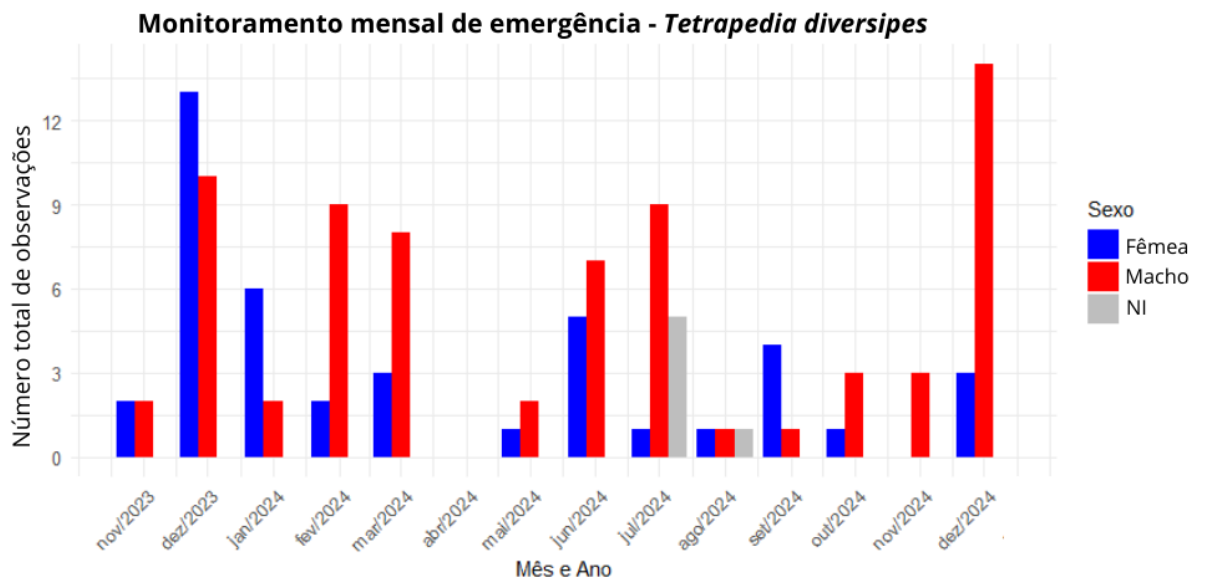
Espécie	Sexo	Quantidade
<i>Tetrapedia diversipes</i>	Fêmea	42
<i>Tetrapedia diversipes</i>	Macho	71
<i>Tetrapedia diversipes</i>	NI	6
<i>Tetrapedia curvitaris</i>	Fêmea	15
<i>Tetrapedia curvitaris</i>	Macho	22

<i>Tetrapedia curvitaris</i>	NI	1
<i>Centris analis</i>	Fêmea	79
<i>Centris analis</i>	Macho	201
<i>Centris analis</i>	NI	2
Abelhas Megachilidae	NI	28
Vespas	NI	86
Coleopteros	NI	1
Dipteras	NI	1
Total	-	555

Fonte: elaborada pela autora.

A relação entre as taxas de emergência (soma do número de observações de indivíduos emergidos) de *Tetrapedia diversipes* a cada mês no período de novembro de 2023 a dezembro de 2024 é demonstrado pelo Gráfico 1.

Gráfico 1 - Quantidade total de indivíduos emergidos de *Tetrapedia diversipes* a cada mês no período de novembro de 2023 a dezembro de 2024, separado por sexo (NI = não identificado).



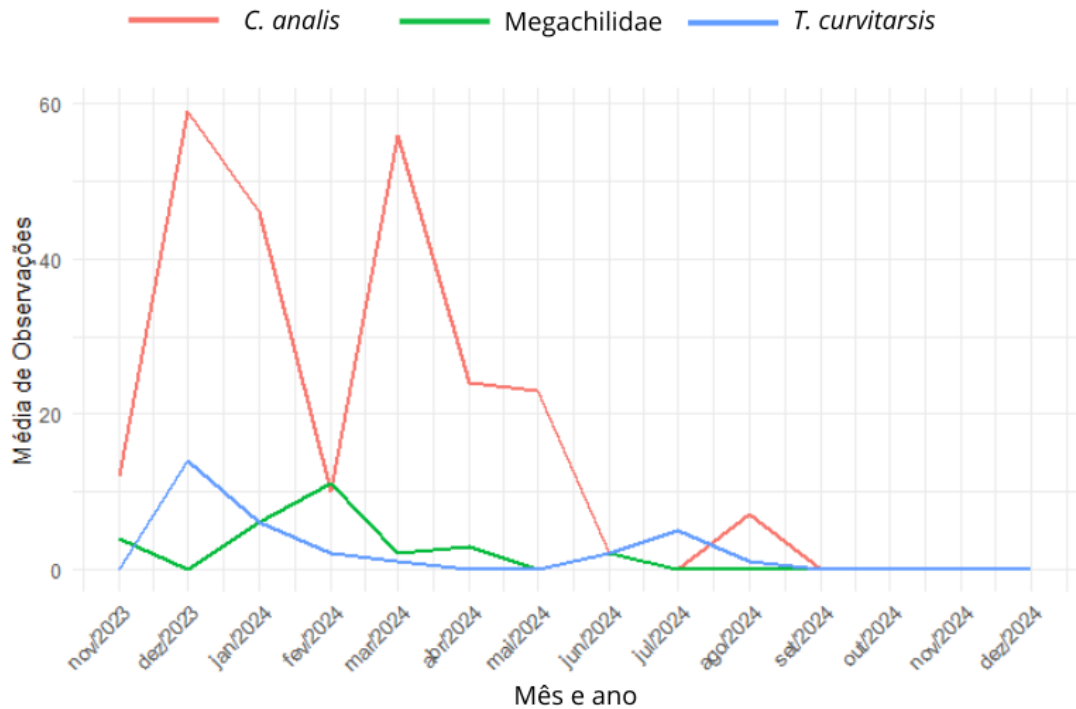
Fonte: elaborado pela autora.

Indivíduos emergidos em dezembro de 2023 e janeiro e março de 2024 foram utilizados para bioensaios, sendo os de dezembro destinados a experimentos pilotos para ajuste da metodologia. A comparação da razão sexual entre macho e fêmea em dezembro de 2023 e dezembro de 2024 é discrepante (Gráfico 1).

O gráfico 1 e 2 demonstram o início da queda de emergência a partir de abril de 2024, para todos os indivíduos obtidos em maioria neste estudo pela metodologia de coleta por *trap nests*.

Gráfico 2 - Quantidade total de indivíduos emergidos de *Centris analis*, abelhas Megachilidae e *Tetrapedia curvitaris*, a cada mês no período de novembro de 2023 a dezembro de 2024, separado por sexo (NI = não identificado).

Monitoramento mensal de emergência - Demais espécies de abelha

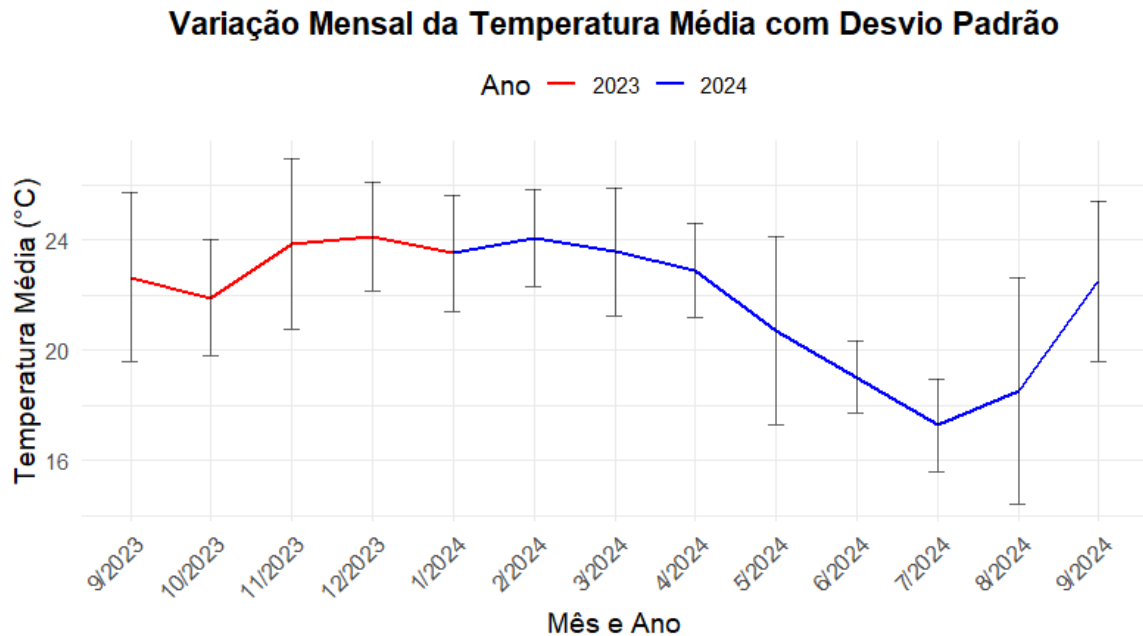


Fonte: elaborado pela autora.

Quanto aos indivíduos de outras espécies, o pico das taxas de emergência para *Centris analis* e *Tetrapedia curvitaris* também ocorreu entre dezembro de 2023 e março de 2024, com queda a partir do mês de abril de 2024, se intensificando no período de inverno e sem aumento a partir de setembro, quando se iniciou a primavera de 2024.

Os dados registrados acerca da temperatura média dos meses anteriores à primavera são demonstrados como uma tentativa de compreender o gatilho para a diapausa dos indivíduos observada nos meses seguintes (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Variação Mensal de Temperatura média (C°) no período de setembro de 2023 a setembro de 2024 próximo aos pontos de coleta em Sorocaba - SP.



Fonte: elaborado pela autora.

É notória a queda de temperatura nos meses que antecederam o inverno de 2024, com grande variação entre as temperaturas registradas em diferentes dias ao longo do mês de maio de 2024, sugerida pelo desvio padrão (DP = 3, aproximadamente). A dispersão aponta picos e quedas de temperatura fora da média em períodos curtos, como demonstrado em agosto de 2024.

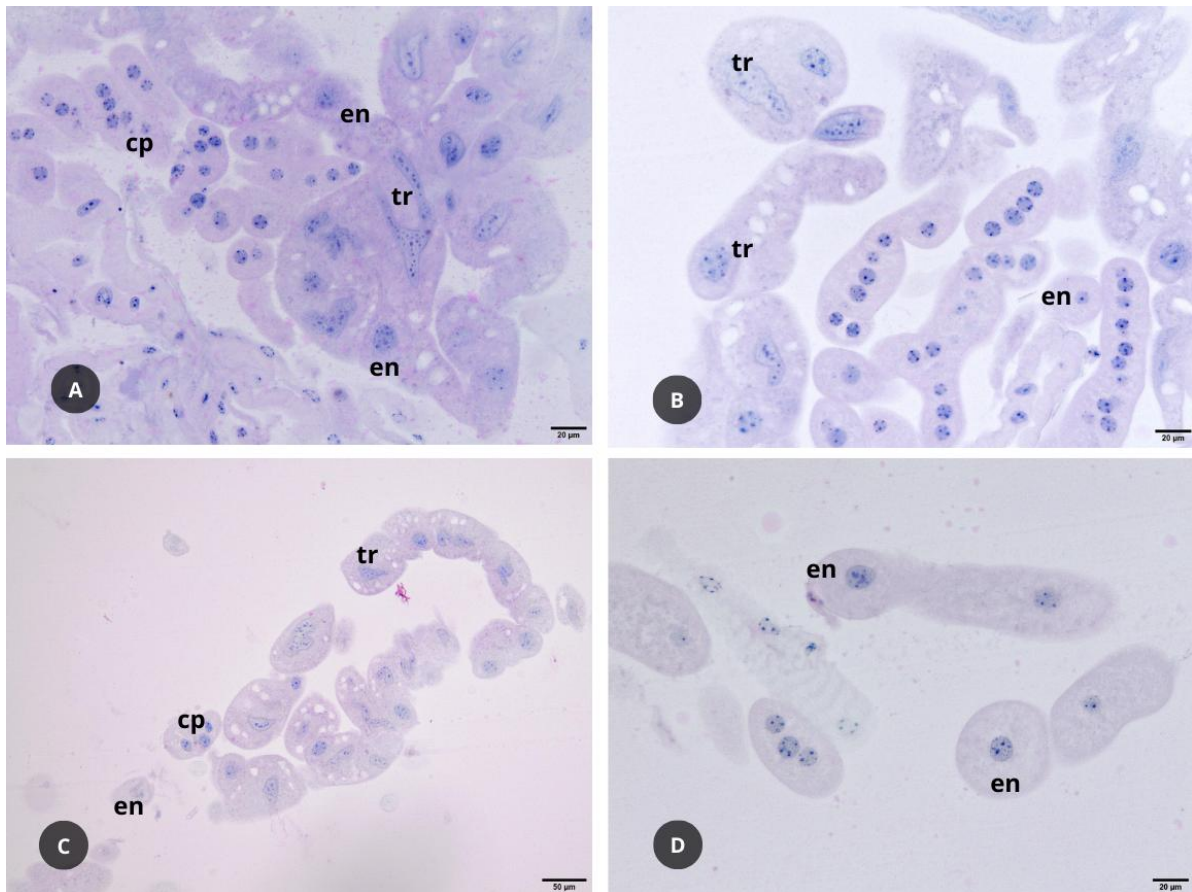
Em relação à abertura dos ninhos para interrupção de diapausa, a verificação ocorreu para 301 ninhos de diferentes períodos referentes às coletas realizadas no ano de 2023 e ao longo de 2024. Do número total, 30 ninhos foram classificados com indivíduos em diapausa, devido à presença de larvas em aparência saudável e com urócitos sub-tegumentares visíveis por toda extensão corpórea.

A tentativa de interrupção de diapausa teve início em 19 de novembro de 2024 e, durante o período compreendido entre o início da tentativa e 20 de dezembro de 2024, apenas um indivíduo macho de *Tetrapedia diversipes* emergiu no tratamento 'quebra de diapausa' (amplitude térmica de 10°C (22° na noite - 32°C no dia) em variação de um ciclo de 12:12 horas (escuro:claro), à 60% de umidade).

5.3 Efeitos da Azadiractina sobre o corpo gorduroso de *Tetrapedia diversipes*

Trofócitos e enócitos foram observados em todas as lâminas histológicas analisadas. Em indivíduos do grupo de controle solvente-acetona (CTL-A), notou-se que os vacúolos presentes nos trofócitos não apresentaram afinidade de coloração pela hematoxilina e/ou eosina em grande maioria, o que não foi observado em porções do corpo gorduroso mais próxima ao vaso dorsal, em que raros trofócitos apresentam depósitos de material corado em eosina (Figura 9).

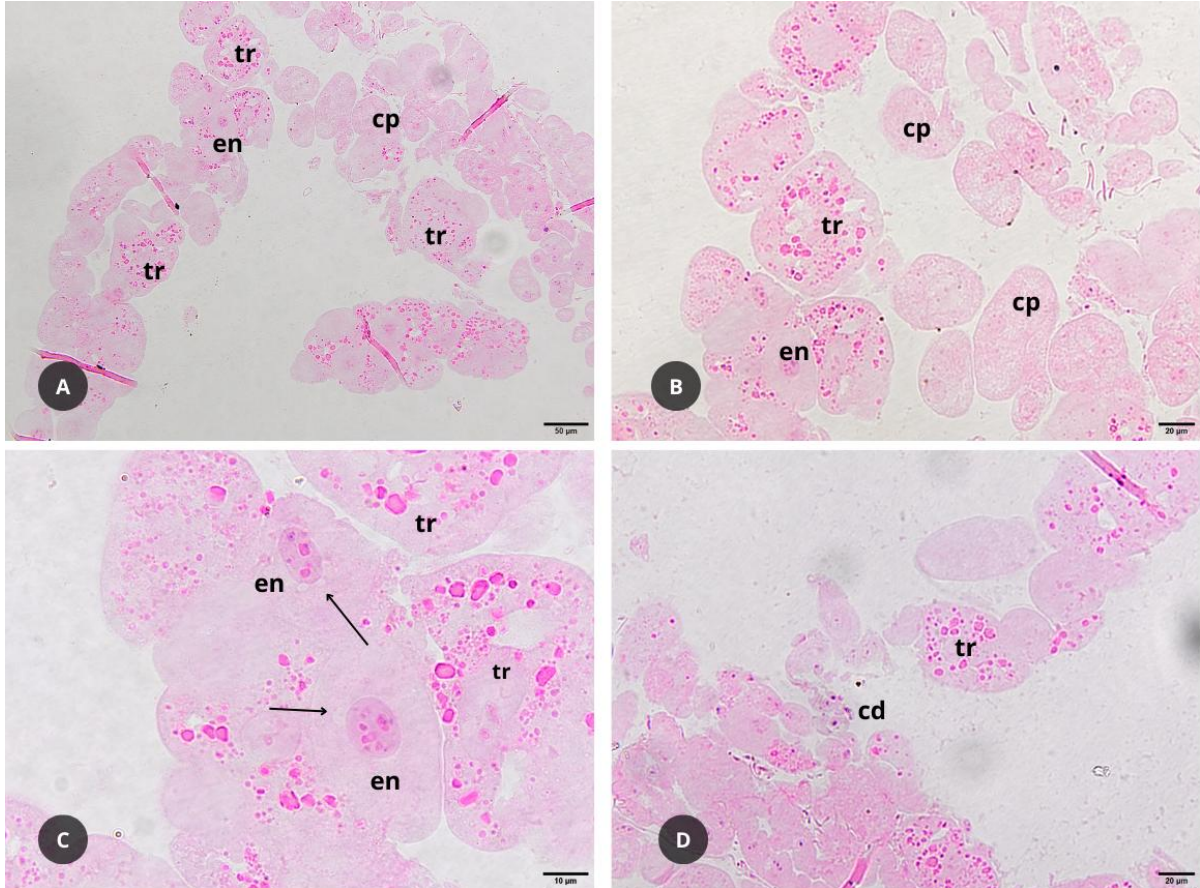
Figura 9 - Células do corpo gorduroso da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* coradas com HE observadas com auxílio de microscópio óptico. Todas as imagens referem-se ao grupo de controle solvente acetona (CTL-A). cp = células pericárdicas; en = enócitos; tr = trofócitos.



Fonte: elaborado pela autora.

Em indivíduos expostos à concentração mais baixa de óleo de nim (FN-I), é possível observar o acúmulo de trofócitos com grânulos citoplasmáticos acidófilos (Figura 10A-D), bem como enócitos com vesículas atípicas ao redor do núcleo (Figura 10C) e presença de nucléolos evidentes no núcleo.

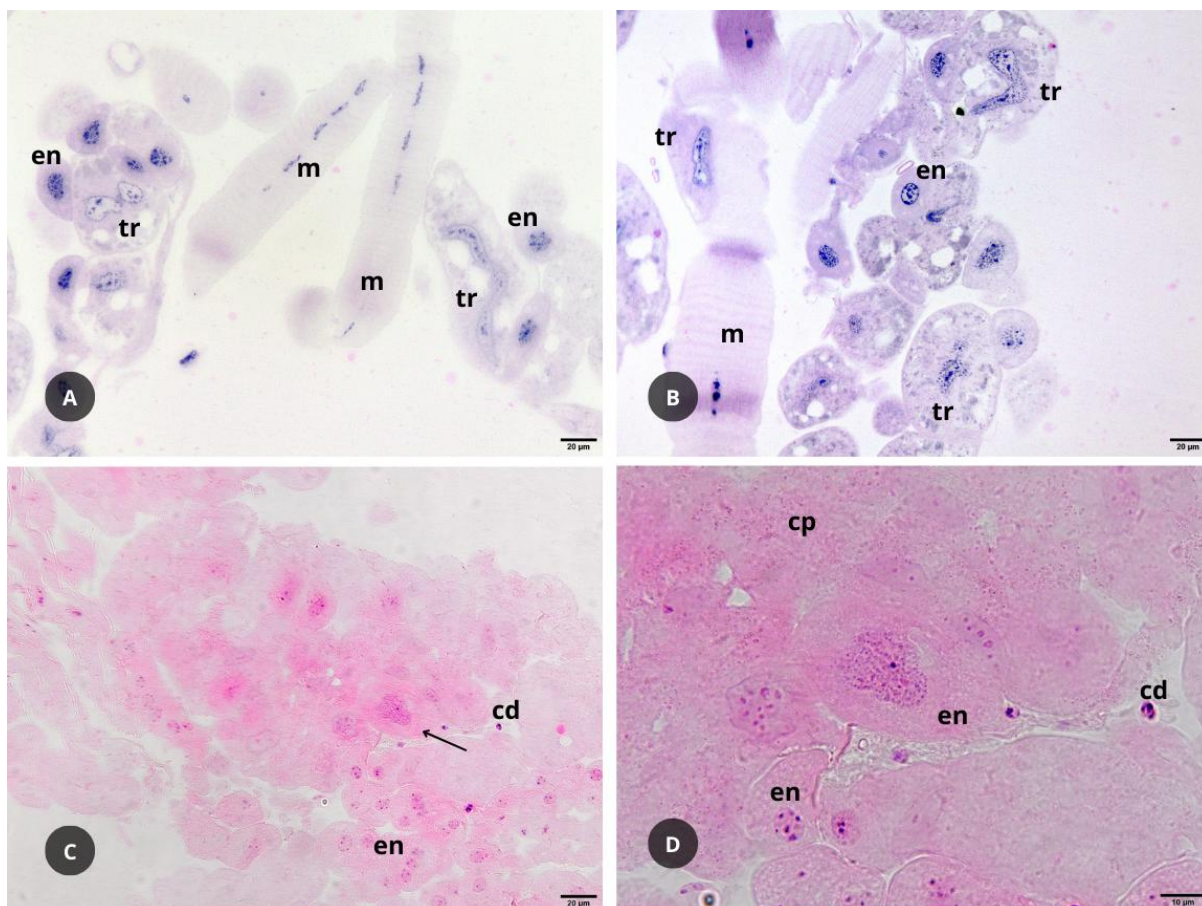
Figura 10 - Células do corpo gorduroso da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* coradas com HE observadas com auxílio de microscópio óptico. Todas as imagens referem-se ao grupo experimental 1 (FN-I). seta = núcleo com vesículas atípicas ao redor e presença de nucléolos; cp = células pericárdicas; en = enócitos; tr = trofócitos; cd = células de defesa.



Fonte: elaborado pela autora.

Em indivíduos expostos à maior concentração de óleo de nim (FN-II, figura 11), notou-se um padrão morfológico distinto dos trofócitos em comparação com os trofócitos dos demais grupos experimentais, com vacuolização mais pronunciada no citoplasma e granulações nucleares mais evidentes, enquanto que os enócitos apresentaram grumos de compactação cromatínica nuclear e alguns vacúolos atípicos no seu citoplasma. Além disso, há a presença de enócitos morfológicamente atípicos, com núcleo irregular (Figura 11C-D).

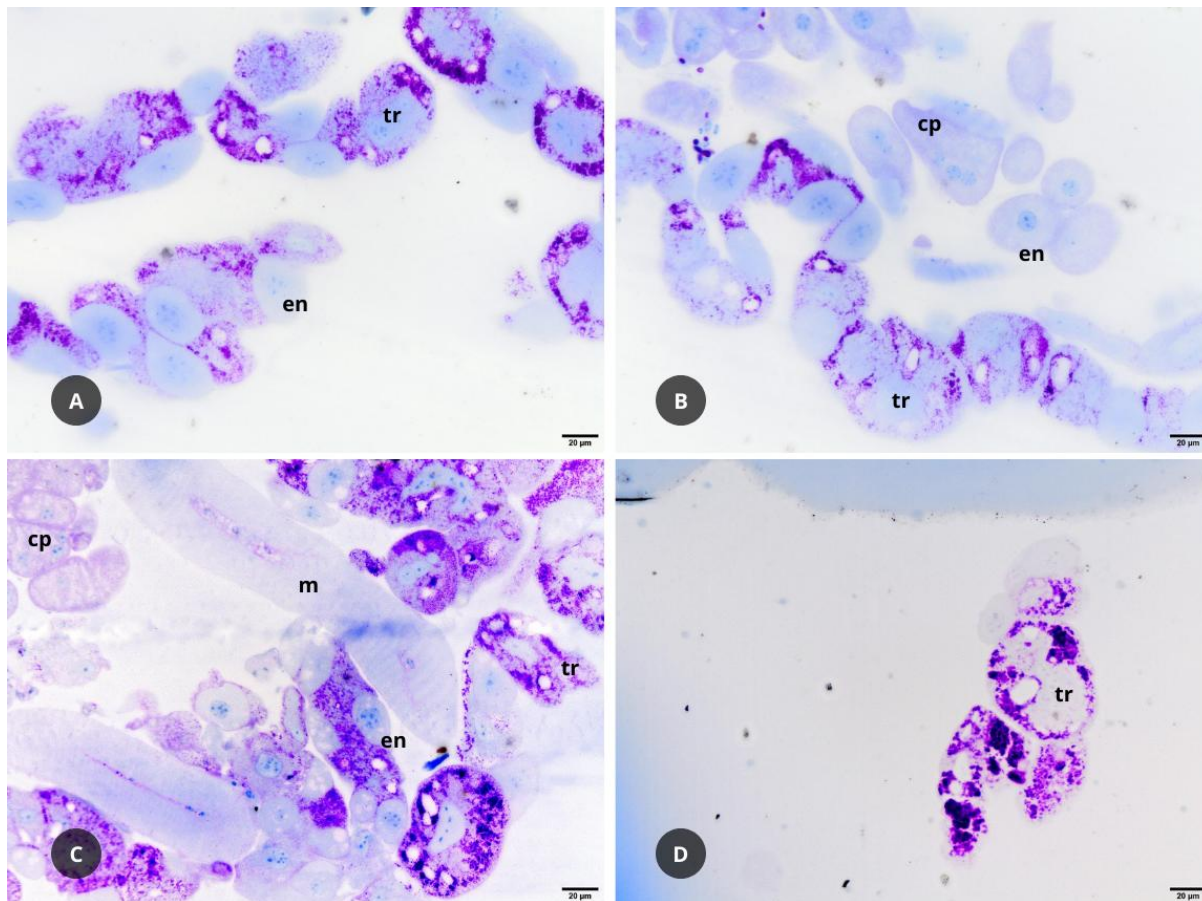
Figura 11 - Células do corpo gorduroso da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* coradas com HE observadas com auxílio de microscópio óptico. Todas as imagens referem-se ao grupo experimental 2 (FN-II). seta = enócito morfologicamente atípico. Presença de núcleo irregular no enócito em 11D (observado em objetiva de 100x); cp = células pericárdicas; en = enócitos; tr = trofócitos; cd = células de defesa; m = musculatura.



Fonte: elaborado pela autora.

Em coloração de PAS e Azul de bromofenol, nota-se a presença de carboidratos na forma de glicogênio no citoplasma dos trofócitos, corados em magenta pelo PAS (Figura 12) e, adicionalmente, essa reação foi negativa nos vacúolos citoplasmáticos no mesmo grupo celular, indicando ausência de depósitos de glicoconjugados ou carboidratos neutros.

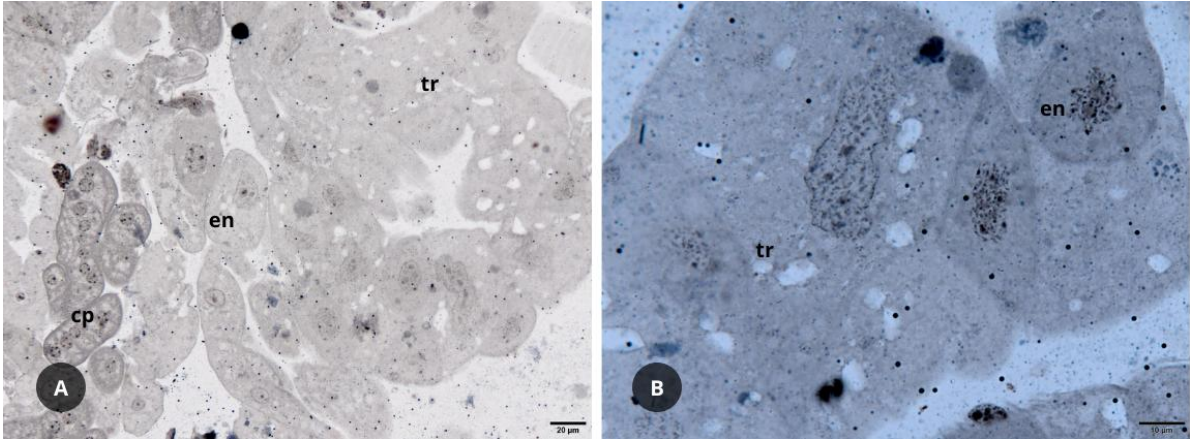
Figura 12 - Células do corpo gorduroso da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* coradas com PAS e Azul de Bromofenol observadas com auxílio de microscópio óptico. (A) e (B) Grupo de controle solvente (CTL-A); (C) Grupo experimental 1 (FN-I); (D) Grupo experimental 2 (FN-II). cp = células pericárdicas; en = enócitos; tr = trofócitos; m = musculatura.



Fonte: elaborado pela autora.

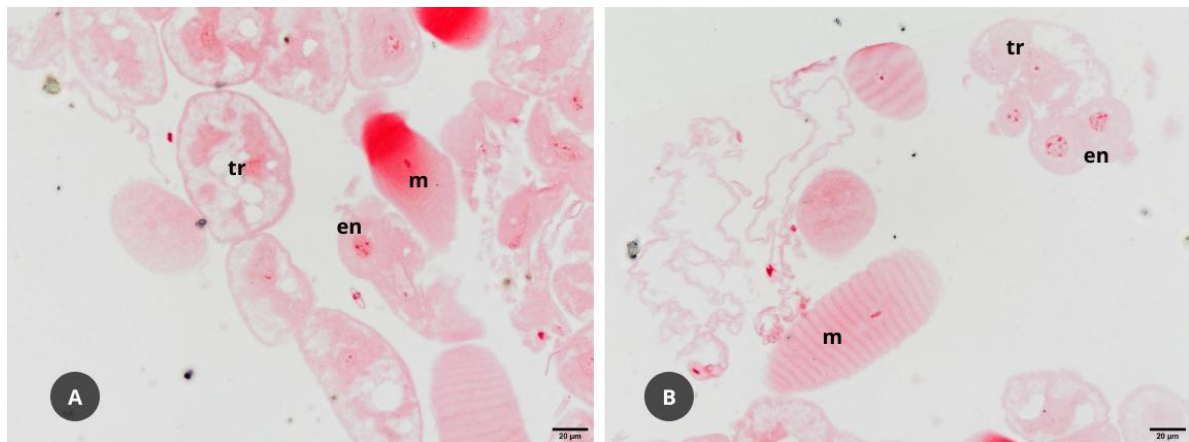
No corpo gorduroso corado com Sudan Black (Figura 13) e Xylidine Ponceau (Figura 14), notou-se que os grânulos citoplasmáticos dos trofócitos não apresentaram composição lipídica e proteica, respectivamente, sendo a vacuolização citoplasmática (negativas para os corantes histoquímicos empregados) diferenciada dos depósitos comuns dessas células de reserva.

Figura 13 - Células do corpo gorduroso da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* coradas com Sudan Black observadas com auxílio de microscópio óptico. (A) Grupo experimental 1 (FN-I); (B) Grupo experimental 2 (FN-II), observado em objetiva de 100x. cp = células pericárdicas; en = enócitos; tr = trofócitos; m = musculatura.



Fonte: elaborado pela autora.

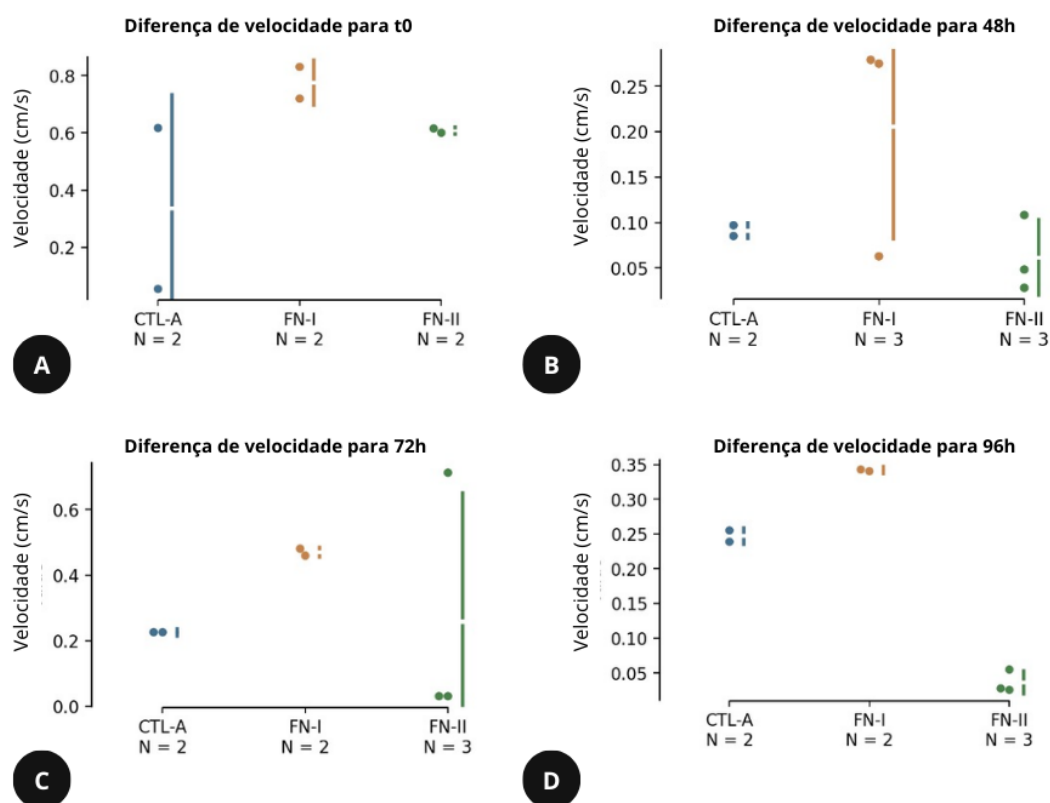
Figura 14 - Células do corpo gorduroso da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* coradas com Xylidine Ponceu observadas com auxílio de microscópio óptico. (A) e (B) Grupo experimental 2 (FN-II). cp = células pericárdicas; en = enócitos; tr = trofócitos; m = musculatura.



Fonte: elaborado pela autora.

5.4 Efeitos da Azadiractina sobre o comportamento de *Tetrapedia diversipes*

Figura 15 - Diferença das médias obtidas para velocidade entre os grupos experimentais, separados por período de filmagem. (A) período inicial, filmagem logo após a aplicação do FitoNeem; (B) Período após 48 horas desde a exposição; (C) Período após 72 horas desde a exposição; (D) Período após 96 horas desde a exposição.



Fonte: elaborado pela autora.

O valor obtido para a diferença entre as médias de CTL-A e FN-I (Figura 15A) foi de 0,44, com intervalo de confiança (IC) de 95,0% (0,103 e 0,721). Já o valor para a diferença entre CTL-A e FN-II é de 0,272, com intervalo de confiança de 95,0% (-0,0168 e 0,554). O valor de P do Teste T foi de 0,663.

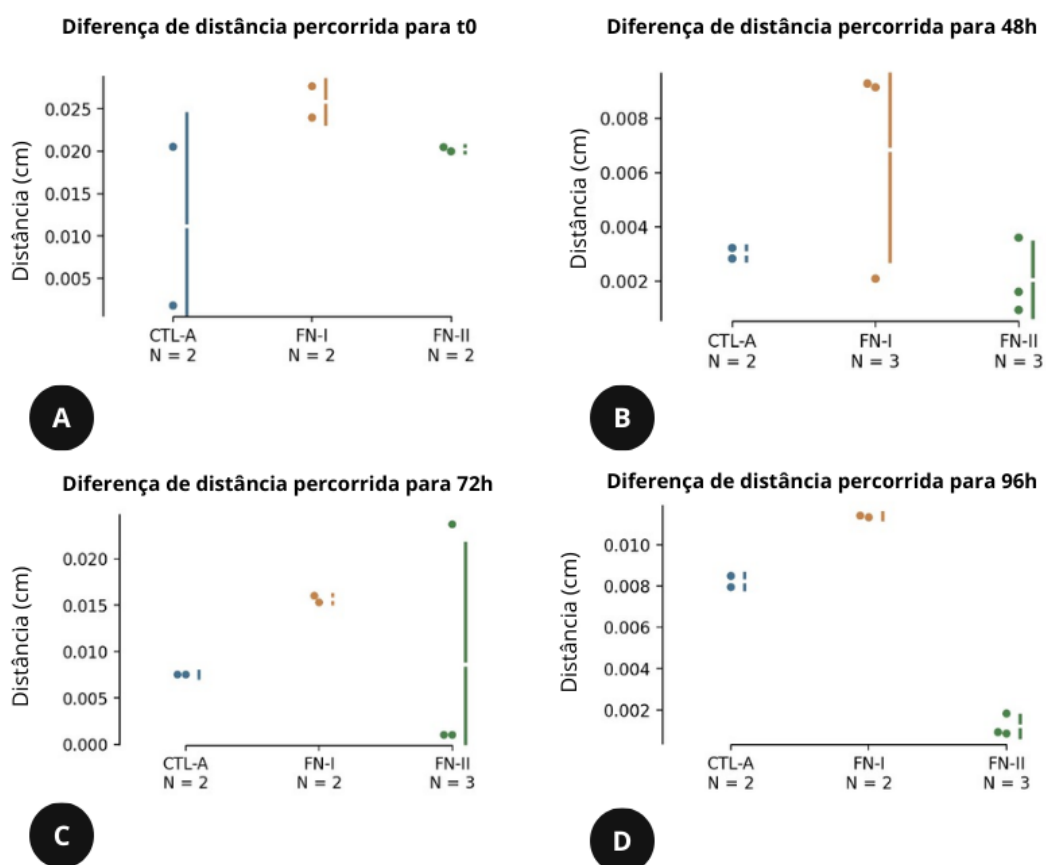
Para CTL-A e FN-I (Figura 15B) o valor obtido foi de 0,115 (95,0%CI de -0,0342 e 0,188). A diferença entre CTL-A e FN-II foi de -0,0295 (95,0%CI de -0,0621 e 0,0172). O valor de P do Teste T foi de 0,333.

Em 15C, tem-se o valor de 0,244 (95,0%CI de 0,233 e 0,244) para a diferença de média entre CTL-A e FN-I. Para CTL-A e FN-II, tem-se o valor de diferença de 0,032 (95,0%CI de -0,195 e 0,259). O valor de P do Teste T foi de 0,904.

Por fim, em 15D, a diferença entre as médias de CTL-A e FN-I é de 0,0946 (95,0%CI de 0,0853 e 0,103), de forma que entre CTL-A e FN-II foi de -0,211 (95,0%CI de -0,229 e -0,193). O valor de P do Teste T foi de 0,0. A partir disso, há a indicação de que os indivíduos expostos à maior concentração de óleo de nim tiveram a menor velocidade de movimento após 96 horas de exposição.

É importante ressaltar que o N amostral para 24 horas foi de N=1, de forma que não foi possível incluí-lo na análise dos dados.

Figura 16 - Diferença das médias obtidas para distância percorrida pelos indivíduos entre os grupos experimentais, separados por período de filmagem.



Fonte: elaborado pela autora.

O valor obtido para a diferença entre as médias de CTL-A e FN-I (Figura 16A) foi de 0,0146 (95,0%CI de 0,00343 e 0,024). Já o valor para a diferença entre CTL-A e FN-II é de 0,00907 (95,0%CI de -0,000546 e 0,0184). O valor de P do Teste T foi de 0,663.

Para CTL-A e FN-I (Figura 16B) o valor obtido foi de 0,00381 (95.0%CI de -0,00114 e 0,00626). A diferença entre as médias de CTL-A e FN-II foi de -0,00098 (95.0%CI de -0,0020 e 0,000574). O valor de P do Teste T foi de 0,303.

Em 16C, tem-se o valor de 0,00812 (95.0%CI de 0,00776 e 0,00812) para a diferença de média entre CTL-A e FN-I. Para CTL-A e FN-II, tem-se valor de diferença de 0,00106 (95.0%CI de -0,0065 e 0,00862). O valor de P do Teste T foi de 0,934.

Por fim, em 16D, a diferença entre as médias de CTL-A e FN-I é de 0,00315 (95.0%CI de 0,00284 e 0,00342), de forma que a diferença entre CTL-A e FN-II foi de -0,00701 (95.0%CI de -0,00761 e -0,00642). O valor de P do Teste T foi de 0,0. Há a indicação, assim, de que os indivíduos expostos à maior concentração de óleo de nim percorreram menores distâncias após 96 horas de exposição.

É importante ressaltar que o N amostral para 24 horas foi de N=1, de forma que não foi possível incluí-lo na análise dos dados.

6 DISCUSSÃO

Para avaliação dos resultados histológicos, o neonicotinoide imidacloprido foi utilizado como padrão de referência de toxicidade, como demonstrado por Assis *et al.* (2022) para *Tetrapedia diversipes*, em que as células do corpo gorduroso no controle solvente (acetona) apresentaram as mesmas características morfológicas que as células do grupo controle. Assim, utiliza-se o grupo CTL-A do presente estudo para comparação com células dos indivíduos expostos à menor (FN-I) e maior concentração de óleo de nim (FN-II).

Os sintomas histopatológicos encontrados nas células do corpo gorduroso (enócitos e trofócitos) após a exposição de 96 horas a Azadiractina se assemelham aos observados para o imidacloprido (Assis *et al.*, 2022) – enócitos morfológicamente atípicos com vacuolização no citoplasma, bem como núcleo alterado e irregular contendo grumos de compactação cromatínica. O padrão morfológico dos trofócitos foi caracterizado como distinto dos demais grupos experimentais à maior concentração de óleo de nim, com vacuolização acidófila citoplasmática pronunciada e granulação nuclear evidente.

A análise histoquímica indicou a presença de carboidratos na forma de glicogênio no citoplasma dos trofócitos dos indivíduos expostos a ambas concentrações de óleo de nim, assim como também evidenciado para indivíduos expostos ao imidacloprido após o mesmo período de exposição tópica (96 horas). O conteúdo dos grânulos citoplasmáticos dos trofócitos das abelhas expostas a Azadiractina, no entanto, não apresentou lipídios ou proteína, sendo a vacuolização citoplasmática diferenciada em relação a de referência, uma vez que Assis *et al.* (2022) demonstraram resultado positivo para proteínas para o grupo exposto ao imidacloprido. A redução de depósitos de lipídios nos trofócitos também foi observada como resultado da exposição de *Ceraeochrysa claveri* a Azadiractina e Piriproxifeno (Scudeler *et al.*, 2019; Scudeler *et al.*, 2022), bem como em demais experimentos com inseticidas químicos para *Culex quinquefasciatus* e *Apis mellifera* (Alves *et al.*, 2010; Domingues *et al.*, 2017).

Os grânulos citoplasmáticos que não apresentaram lipídios ou proteínas podem estar relacionados a depósitos de cálcio, por exemplo, considerado um mecanismo de defesa celular, sendo um biomarcador relevante que serve como indicativo da ativação do processo de desintoxicação (Nogarol; Fontanetti, 2010; Souza; Fontanetti,

2011; Scudeler *et al.*, 2019; Scudeler *et al.*, 2022). Portanto, sugere-se a verificação de grânulos citoplasmáticos contendo cálcio nas células do corpo gorduroso de *Tetrapedia diversipes* em estudos futuros.

Assis *et al.* (2022) ainda demonstrou que a vacuolização citoplasmática e alteração nos núcleos dos enócitos não possui relação com o sexo dos indivíduos. Os vacúolos e alterações nucleares nos enócitos observados para fêmeas de *Tetrapedia diversipes* expostas ao óleo de nim são relevantes biomarcadores celulares que evidenciam a tendência de alterações histopatológicas subletais causadas pela exposição a Azadiractina, e a relevância destas modificações como indicativo de mudanças causadas por pesticidas é descrita por Malaspina e Silva-Zacarin (2006). O presente estudo sugere a importância de incorporar tal interpretação às mudanças histológicas e morfológicas causadas também por compostos naturais que, apesar de subletais para Azadiractina, ainda causaram alterações sobre o padrão celular de enócitos e trofócitos.

Alterações subletais causadas pela Azadiractina também foram observadas para larvas de *Partamona helleri*, como atraso do desenvolvimento, deformação e atrofia do sistema reprodutivo (Bernardes *et al.*, 2018), bem como efeitos citotóxicos sobre células e ultraestrutura do músculo do intestino de *Ceraeochrysa claveri* (Scudeler *et al.*, 2016; Scudeler *et al.*, 2017), demonstrando efeitos negativos do óleo de nim sobre outras espécies não alvo.

Em relação ao comportamento dos indivíduos após a exposição aguda tópica com óleo de nim, para cada grupo experimental, a análise estatística realizada para compreender as diferenças de médias obtidas para velocidade bem intervalo de confiança (IC95,0%) e Teste T, em tempo zero, demonstram que, de forma geral, não há evidência suficiente de que os grupos são diferentes. Apesar da diferença estatisticamente significativa observada para a diferença de média entre CTL-A e FN-I no tempo 0 indicada pelo intervalo de confiança (0,103 e 0,721), o valor do Teste T ($p > 0,05$) indica a tendência de que as diferenças observadas sejam ruído resultante de um tamanho amostral pequeno, que aumenta a incerteza e amplia os valores de Intervalo de Confiança. O mesmo acontece para as médias obtidas após 72 horas para CTL-A e FN-II (IC95% 0,233 e 0,244) que, apesar de baixa diferença, o valor do Teste T ($p > 0,05$) indica que as diferenças observadas podem ser explicadas pelo acaso. No entanto, a diferença observada tanto entre CTL-A e FN-I e CTL-A e FN-II

após 96 horas se demonstraram estatisticamente significativas, confirmado pelo Teste T ($p < 0,5$).

Para as diferenças observadas entre as médias obtidas para a distância percorrida pelos indivíduos de cada grupo experimental, o mesmo foi observado: apesar de haver diferença significativa entre os indivíduos representativo do controle solvente acetona (CTL-A) e os representativos da concentração mais baixa (FN-I) (IC95,0% 0,00343 e 0,024) no tempo 0, o valor do Teste T indica que não há evidência de diferença entre todos os grupos ($p > 0,05$). O mesmo, assim como observado para a velocidade, também é verificado para as médias obtidas após 72 horas: apesar da comparação entre CTL-A e FN-I ser significativa com base no intervalo de confiança, o Teste T não detectou diferenças relevantes entre os grupos como um todo ($p > 0,05$). As diferenças de média observadas após 96 horas de exposição, tanto para CTL-A e FN-I e CTL-A e FN-II foram evidenciadas tanto pelos valores do Intervalo de Confiança, quanto pelo valor obtido para o Teste T ($p < 0,05$), indicando haver diferenças significativas quando os grupos são analisados em dupla quanto globalmente.

Levando em consideração que os enócitos são células envolvidas no processo de desintoxicação e foram evidenciados com a presença de vacuolização atípica ao redor do núcleo nos grupos após 96 horas de exposição, sugere-se uma tendência de maior demanda energética da abelha direcionada para o desempenho da função de desintoxicação, como observado para abelhas *P. helleri* expostas ao imidacloprido (Gong; Diao, 2017; Rand *et al.*, 2015), o que diminuiria a quantidade de energia destinada à mobilidade e deslocamento, sobretudo do grupo FN-II exposto à maior concentração de óleo de nim. Embora haja um N amostral pequeno da análise comportamental, os dados se conjugam com a histologia, visto que esta também foi realizada após 96 horas após a exposição tópica. Assim, há a tendência de que a velocidade e distância percorrida por esses indivíduos expostos à maior concentração do óleo de nim tenha sido menor após 96 horas, quando comparadas aos valores obtidos referentes aos mesmos parâmetros dos indivíduos expostos a menor concentração de óleo de nim (FN-I) e ao solvente acetona (FN-II).

Com a mesma metodologia de *video-tracking*, Teeters *et al.* (2012) demonstraram que abelhas *Apis mellifera* do grupo controle percorreram uma distância significativamente maior do que abelhas expostas a concentrações de 50 e 500 ppb de imidacloprido, que apresenta efeito estimulante na atividade locomotora

nas concentrações mais baixas e o efeito oposto na concentração mais alta, o que também foi visto para o óleo de nim neste estudo. Indivíduos de *Apis mellifera* expostos a uma dose subletal de piretroides também exibiram locomoção reduzida quando comparados aos indivíduos do controle, com redução da distância total percorrida, e há evidência de que o decréscimo de movimento seja resultado de sintomas comuns de exposição a piretroides, como perda de coordenação motora, convulsões e paralisia (Ingram *et al.*, 2015).

Sugere-se a necessidade do aumento do N amostral para estudos futuros, de forma que a comparação entre os efeitos causados pelo bioinseticida óleo de nim e o neonicotinoide imidacloprido seja ainda mais descritiva acerca dos efeitos subletais sobre o comportamento de locomoção de *Tetrapedia diversipes*, bem como os sintomas resultantes da exposição com Azadiractina em outros parâmetros de comportamento da espécie. Para que isso seja possível, há necessidade de um aprimoramento do monitoramento de nidificação no campo com mais pontos de amostragem e/ou o estabelecimento de um protocolo de quebra de diapausa em condições laboratoriais.

Quanto ao monitoramento da nidificação de *Tetrapedia diversipes* realizado neste estudo, levando em consideração que se trata de uma espécie bivoltina que apresenta mais de um ciclo reprodutivo anual, sabe-se que fatores abióticos e bióticos da área de estudo influenciam parâmetros como a taxa de construção de ninhos, quantidade de células de cria por ninho, taxa de mortalidade e parasitismo e diapausa, para além da taxa de emergência da espécie (Alves-dos-Santos; Machado; Gaglianone, 2007; Assis, 2022; Cavalcante *et al.*, 2019). O florescimento de plantas, sobretudo da família Malpighiaceae, também apresenta influência sobre o aumento da taxa de ninhos e de células construídas por *Tetrapedia diversipes* (Assis, 2022; Rocha-Filho; Garofalo, 2016).

Apesar de se compreender que, naturalmente, existe a tendência da segunda geração (outono e inverno) de *Tetrapedia diversipes* retardar seu desenvolvimento (Santos; Arias, 2018; Cordeiro, 2019) acredita-se que as dispersões atípicas de temperatura (sobretudo em maio e agosto de 2024) possam ter prolongado o retardamento do desenvolvimento larval, levando à diapausa ainda mais extensa, uma vez que é comum o aumento do tempo de desenvolvimento de metamorfose na estação fria e seca em comparação com a estação quente e úmida (Assis, 2022). Além disso, Cavalcante *et al.* (2019) observaram que cada fêmea de *Tetrapedia*

diversipes constrói de 2 a 3 ninhos ao longo da vida reprodutiva, e a finalização deles leva em torno de 3 a 15 dias, gerando ao máximo 15 células de cria. A baixa frequência de nidificação atrelada à baixa densidade populacional já foi descrita como um desafio para o manejo da espécie (Garofalo, 2012; Assis, 2022).

A maior emergência de indivíduos fêmeas observada foi em dezembro de 2023 e janeiro de 2024, e a emergência de machos ocorreu tanto na estação chuvosa (de janeiro a março) quanto em dois meses de estação seca (junho e julho de 2024), com maior pico de emergência em dezembro de 2024. Assis (2022) demonstrou que a taxa de construção de ninhos foi mais alta no outono, seguido do verão e primavera, e que a maior emergência de indivíduos ocorreu em agosto e setembro de 2019, o que contrasta com os resultados obtidos no presente estudo. Como exposto brevemente, a mortalidade de ninhos e parasitismo também são capazes de explicar a baixa emergência de abelhas após a primavera, visto que os índices são de 33,80% de mortalidade e 55,46% de parasitismo no verão (Assis, 2022).

Para estudos futuros, sugere-se que o manejo da emergência de *Tetrapedia diversipes* ocorra por meio do controle de temperatura sincronizado com a disponibilidade de recursos florais e a floração em geral, abordagem utilizada amplamente com espécies de *Osmia sp* e *Megachile sp* (Bosch *et al.*, 2000; Bosch *et al.*, 2006) em ambientes de clima temperado e que pode ser uma solução para vencer o desafio de diapausa registrado.

7 CONCLUSÃO

A análise global dos resultados obtidos indica a tendência de que a Azadiractina causa efeitos subletais em *Tetrapedia diversipes* ao induzir efeitos histopatológicos em células do corpo gorduroso, o que pode afetar as diversas funções que este órgão desempenha, bem como sobre o comportamento de locomoção dos indivíduos. Este estudo traz informações relevantes para estudos ecotoxicológicos ao apresentar tendências de efeitos subletais sobre a abelha nativa solitária *Tetrapedia diversipes*, e os resultados obtidos sugerem que as concentrações indicadas para aplicação no campo na bula da fórmula comercial não são seguras para a espécie. No entanto, destaca-se a necessidade do aumento do número amostral para que os efeitos sejam mensurados e descritos com maior detalhamento, uma vez que efeitos subletais devem ser estudados com base em diversos estágios do desenvolvimento de um organismo. Destaca-se que o presente estudo é um pioneiro acerca dos efeitos de um bioinseticida sobre uma abelha nativa solitária neotropical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, F.C., DOMINGUES, C.E. DA C. **Hepato-nephrocytic system: a novel model of biomarkers for analysis of the ecology of stress in environmental biomonitoring.** PLoS One 10. 2015.
- AGUIAR, A. J. C., MARTINS, C. F. **Abelhas e vespas solitárias em ninhos-armadilha na Reserva Biológica Guaribas** (Mamanguape, Paraíba, Brasil). Revista Brasileira de Zoologia, vol. 19, no. suppl 1, pp. 101–116, 2002.
- AGUIAR-MENEZES, E. L. **Inseticidas Botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 58 p. (Documentos, 205). 2005.
- ANDRADE, D. C.; ROMEIRO, A. R. **Serviços ecossistêmicos e sua importância para o sistema econômico e o bem estar humano.** IE/UNICAMP, Campinas, n. 155, 2009.
- ASSIS, J. C. *et al.* **Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810).** v. 304, p. 119140–119140, 1 jul. 2022.
- ALTIERI, M. A. **Agroecologia: a dinâmica produtiva da agricultura sustentável.** 3.ed. Porto Alegre: Editora da Universidade – UFRGS (Síntese Universitária, 54), 2001.
- ALVES-DOS-SANTOS, I.; MACHADO, I. C.; GAGLIANONE, M. C. **História natural das abelhas coletoras de óleo.** Oecologia Brasiliensis, v. 11, n. 4, p. 544-557, 2007.
- ALVES, S. N.; SERRÃO, J. E.; MELO, A. L. **Alterations in the fat body and midgut of *Culex quinquefasciatus* larvae following exposure to different insecticides.** Micron, v. 41, n. 6, p. 592–597, ago. 2010.
- BALSAMO, P. J. *et al.* **Impact of sublethal doses of thiamethoxam and *Nosema ceranae* inoculation on the hepato-nephrocytic system in young Africanized *Apis mellifera*.** Journal of Apicultural Research, [S.L.], v. 59, n. 4, p. 350-361, nov. 2020.
- BARBOSA, W. F., *et al.* **Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*.** Environ Toxicol Chem., v.34, n. 9, p. 2149-58, 2015.
- BARBOSA, D. B. *et al.* **As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização.** Revista Eletrônica Científica da UERGS, v. 3, n. 4, p. 694–703, 2017.
- BATRA, S. W. T. **Solitary Bees.** Scientific American, v. 250, n. 2, p. 86-93, 1984.
- BAWA, K.S. **Plant-pollinator interactions in tropical rain forests.** Annual Review of Ecology and Systematics, v. 21, p. 399-422, 1990.

- BENÍCIO, D. A.; NETO, V. Q.; SOUSA, J. G. **Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), cultivado no município de Patos - Paraíba.** 2009.
- BERINGER, J., MACIEL, F. L., TRAMONTINA, F. F. **O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras.** Revista Eletrônica Científica Da UERGS, 5(1), 18-27, 2019.
- BERNARDES, R. C. *et al.* **The reduced-risk insecticide azadirachtin poses a toxicological hazard to stingless bee *Partamona helleri* (Friese, 1900) queens.** Chemosphere, v. 201, p. 550–556, 2018.
- BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F. *et al.* **Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 19, n. 01, p. 46–50, 2010.
- CAMILLO, E. **Nesting biology of four *Tetrapedia* species in trap-nests (Hymenoptera: Apidae: Tetrapediini).** Revista de Biologia Tropical, vol. 53, no. 1–2, pp. 175–186, 2005.
- CAVALCANTE, A. M. **Nicho trófico e aspectos bionômicos da abelha solitária *Tetrapedia diversipes* KLUG (Hymenoptera, Apidae, Tetrapediini).** 2016. 58 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- CHAPMAN, R. F. **The Insect: Structure and Function.** Cambridge. University Press p.403. 2013.
- CLARIDGE-CHANG, A.; ASSAM, P. N. **Estimation statistics should replace significance testing.** Nature Methods, v. 13, n. 2, p. 108–109, 2016.
- COPPING, L. G.; MENN, J. J. **Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy.** Pest Management Science. Society of Chemical Industry. v. 56, issue 8, p. 651-676. 2000.
- CORDEIRO, G.; BOFF, S.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Trap-nesting Bees Communities from Protected Areas of Atlantic Forest, Southeastern Brazil.** Sociobiology, v. 66, n. 2, p. 306, 20 ago. 2019.
- CORRÊA, L. S. *et al.* **Estrutura, composição florística e caracterização sucessional em remanescente de Floresta Estacional Semidecidual no Sudeste do Brasil.** Revista Arvore, v. 38, n. 5, p. 799–809, 1 out. 2014.

- COTTON, G.; ANSTEE, J. H. **A biochemical and structural study on the effects of methoprene on fat body development in *Locusta migratoria* L.** Journal of Insect Physiology, Oxford, v. 37, n. 7, p. 525-539, 1991.
- COUSIN, M. *et al.* **Size Changes in Honey Bee Larvae Oenocytes Induced by Exposure to Paraquat at Very Low Concentrations.** PloS one, v. 8, n. 5, p. e65693–e65693, 28 maio 2013.
- CORRÊA, L. S. *et al.* **Estrutura, composição florística e caracterização sucessional em remanescente de Floresta Estacional Semidecidual no Sudeste do Brasil.** Revista Árvore, vol. 38, no. 5, p. 799–809, 2014.
- COSTA-MAIA, F. M., LINO-LOURENÇO, D. A., TOLEDO, V. A. A. **Aspectos Econômicos e Sustentáveis da Polinização por Abelhas.** Sistemas de Produção Agropecuária (ciências agrárias, animais e florestais), p.45-67, 2010.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas.** Editora Unesp. São Paulo. 2009.
- D'ÁVILA, M., MARCHINI, L. C. **Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil.** B.Indústr. Anim, N. Odessa, v.62, n.1, p.79-90, 2005.
- DE GROOT, R.S., WILSON, M.A., BOUMANS, R.M.J. **A typology for the classification, description, and valuation of ecosystem functions, goods and services.** Ecological Economics 41, 393-408, 2002.
- DOMINGUES, C. E. C. *et al.* **Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee.** Chemosphere, [S.L.],v. 186, p. 994-1005, 2017.
- EFSA (European Food Safety Authority). **Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees).** EFSA J11, 1-268, 2013.
- EGGER, D. S. *et al.* **Ecocide in the Cerrados (Brazilian Savanna): agribusiness, water spoliation and pesticide contamination.** Desenvolv. Meio Ambiente, v. 57, Special issue - Agribusiness in times of planetary collapse: critical approaches, p. 16-54. 2021.
- FAO. **Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response.** In: FREITAS, B.M.; PEREIRA, J.O.P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination,** 2004. p. 19-25.
- GONG, Y.; DIAO, Q. **Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees.** v. 26, n. 1, p. 1–12, 7 nov. 2016.

- GONZÁLEZ-GÓMEZ, R. *et al.* **Effects of neem (*Azadirachta indica*) on honey bee workers and queens, while applied to control *Varroa destructor*.** Journal of Apicultural Research, v. 55, n. 5, p. 413–421, 2 dez. 2016.
- GUPTA, S.; DIKSHIT, A. K. **Biopesticides: an ecofriendly approach for pest control.** Journal of Biopesticides, v.3, n. 1, p. 186-188. 2010.
- HEITHAUS, E.R. **Community structure of neotropical flower visiting bees and wasps: diversity and phenology.** Ecology, n. 60, p. 190-202, 1979. HO, J. *et al.* **Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics.** Nature Methods, v. 16, n. 7, p. 565–566, 2019.
- HO, J. *et al.* **Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics.** Nature Methods, v. 16, n. 7, p. 565–566, 19 jun. 2019.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. *et al.* **Cargas polínicas de abelhas polinizadoras de *Byrsonima chrysophylla* Kunth (Malpighiaceae): fidelidade e fontes alternativas de recursos florais.** Acta Botanica Brasilica, v. 22, n. 1, p. 165-171, 2008.
- KEELEY, L. L. **Physiology and biochemistry of the fat body.** In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (Org.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology.** Oxford: Pergamon Press, v. 3, p. 211-248. 1995.
- KERR, W. K., CARVALHO, G.A., NASCIMENTO, V.A. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação.** Paracatu: Acangaú. 1996.
- LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas.** São Paulo: Editora Unesp, 2009.
- LIMA, M. C.; ROCHA, S. A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil.** Brasília: Ibama, 2012.
- LOPES, C.V.A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática.** Saúde em Debate, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.
- LYCETT, G. J.; MCLAUGHLIN, L. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; KAFATOS, F. C.; LOUKERIS, T. G.; PAINE, M. J. I. **Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility.** Insect Molecular Biology 15, 321–327. 2006.
- MALASPINA, O. SILVA-ZACARIN, E.C.M. **Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees.** Braz. J. Morphol. Sci. 23, 303–309. 2006.
- MARCHI, P. **Biologia de nidificação de abelhas solitárias em áreas de Mata Atlântica.** Tese (doutorado) - Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná,

- Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia). Defesa: Curitiba, 2008.
- MATOS, P. F.; PÊSSOA, V. L. S. **A modernização da agricultura no Brasil e novos usos do território**. Geo UERJ. v. 2, n. 22, p. 290-322, 2011.
- MCMANS, J. F. A. **Histological demonstration of mucin after periodic acid**. Nature. 1946.
- MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. **Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package**. Journal of Statistical Software, v. 81, n. 10, 2017.
- MARCOMINI, A. M. *et al.* **Atividade inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera, Tenebrionidae)**. Arquivos do Instituto Biológico. v. 76, n. 3, p. 409–416, 2009.
- MARTINEZ, S. S. **O Nim, *Azadiractina indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. IAPAR, 142 p. Londrina, 2002.
- MELLO, K. D., PETRI, L., LEITE, E. C., TOPPA, R. H. **Cenários ambientais para o ordenamento territorial de áreas de preservação permanente em Sorocaba, SP**. Revista Árvore 38.2, 309-317, 2014.
- MENEZES, G. B., *et al.* **Nesting and use of pollen resources by *Tetrapedia diversipes* Klug (Apidae) in Atlantic Forest areas (Rio de Janeiro, Brazil) in different stages of regeneration**. Revista Brasileira de Entomologia. v. 56, n. 1, p. 86–94, 2012.
- MORDUE (LUNTZ), A. J.; NISBET, A. J. **Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects**. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil, v. 29, n. 4, p. 615–632, 2000.
- MORDUE(Luntz), A.J.; M.S.J. SIMMONDS, S.V; LEY, W.M; BLANEY, W; MORDUE, M;; NASIRUDDIN & A.J. NISBET. **Actions of azadirachtin, a plant allelochemical, against insects**. Pestic. Sci. 54: 277-284. 1998.
- NEFF, J. L.; SIMPSON, B. B. **Oil-collecting structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): morphology, function, and use in systematics**. Journal of the Kansas Entomological Society, v. 54, n. 1, p. 95-123, jan. 1981.
- NEVES, E. J. M. **Importância dos fatores edafo-climáticos para o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em programas florestais e agroflorestais nas diferentes regiões do Brasil**. Boletim de Pesquisa Florestal, n. 49, p. 99-107. 2004.

- NEVES, B. P. ; DE OLIVEIRA, I. P.; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do nim indiano**. 2003.
- NEVES, B. P; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do nim indiano (Azadirachta indica A. Juss)**. Embrapa., 1996.
- NOGAROL, L.R; FONTANETTI, C. S. **Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: tissular responses of the midgut**. Micron 41,239–246. 2010.
- NOGUEIRA-COUTO, R.H.; PEREIRA, J.M.S.; COUTO, L.A. **Estudo da polinização entomófila em Cucurbita pepo (abóbora italiana)**. Científica, v.18, n.1, p.21-27, 1990.
- OKSANEN, *et al.* **Vegan: Community Ecology Package**. R. Package Version 2.5-7. 2020.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). **OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Bumblebee, Acute Contact Toxicity Test No 246**. 2017.
- OLIVEIRA, V. T. P.; CRUZ-LANDIM, C. (2003). **Morphology and fuction of insect fat body cells: A Review**. Biociências, v.11, p.195-205.
- ORMOND, J. G. P. *et al.* **Agricultura Orgânica: Quando o Passado É Futuro**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 15, p. 3-34, 2002.
- PAN, M. L.; BELL, W. J.; TELFER, W. H. **Vitellogenic Blood Protein Synthesis by Insect Fat Body**. Science, v.165, p.393. 1969.
- PAVELA, R.; BENELLI, G. **Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints**. Trends in Plant Science, v. 21, n. 12, p. 1000–1007, 2016.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Jet. Churchill Ltda, London; 1960.
- PELLEGRINO, G. Q.; ASSAD, E. D.; MARIN, F. R. **Mudanças Climáticas Globais e Agricultura no Brasil**. Revista Multiciência, n. 8. Campinas, 2007.
- RAND, E. E. DU *et al.* **Detoxification mechanisms of honey bees (Apis mellifera) resulting in tolerance of dietary nicotine**. Scientific Reports, v. 5, n. 1, 2 jul. 2015.
- RIBAS, P. P; MATSUMURA, A. T. S. **A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente**. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

- ROCHA-FILHO, L. C., L.; GARÓFALO, C. A. **Natural History of *Tetrapedia diversipes* (Hymenoptera: Apidae) in an Atlantic Semideciduous Forest Remnant Surrounded by Coffee Crops, *Coffea arabica* (Rubiaceae).** v. 109, n. 2, p. 183–197, 1 mar. 2016.
- RIGOTTO, R.M., VASCONCELOS, D.P., ROCHA, M.M. **Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública.** Cad. Saúde Pública. v. 30, n. 7, p. 1-3, 2014.
- ROEL, A. R. **A agricultura orgânica ou ecológica e a sustentabilidade da agricultura.** Revista Internacional de Desenvolvimento Local. vol. 3, n. 4, p. 57-62, 2002.
- ROEL, A. R. **Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável.** In: Interações, Campo Grande, UCDB, n.2, p. 43-5, 2001.
- ROMA, G. C.; BUENO, O. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. **Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review.** Micron, v. 41, n. 5, p. 395–401, 2010.
- SANTOS, A. B. **Abelhas nativas: polinizadores em declínio.** Natureza on line, v. 8, n. 3, p. 103-106, 2010.
- SANTOS, D. E. **Modifications in the fat body during the metamorphosis of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae).** 48 f. Dissertação (Mestrado em Análises quantitativas e moleculares do Genoma; Biologia das células e dos tecidos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.
- SCHLINDWEIN, C. **Abelhas Solitárias e Flores: Especialistas são Polinizadores Efetivos?** In: 55º Congresso Nacional de Botânica 26º Encontro Regional de Botânicos de MG, BA e ES. Simpósios, Palestras e Mesas Redondas, CD-ROM, p. 1–8, 2004.
- SCUDELER, E.L. *et al.* **Cytotoxic effects of neem oil in the midgut of the predator *Ceraeochrysa claveri*.** Micron. v. 80, p. 96-111, 2016.
- SCUDELER, E. L. *et al.* **Midgut and fat body: Multisystemic action of pyriproxyfen on non-target organism *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae).** Environmental Pollution, v. 293, p. 118580–118580, 1 jan. 2022.
- SCUDELER, E. L. *et al.* **Neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) affects the ultrastructure of the midgut muscle of *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae).** Acta Histochemica. v. 119, p. 84-91, 2017.
- SCUDELER, E. L.; GARCIA, A.S.G.; PADOVANI, C.R; SANTOS, D.C. **Pest and natural enemy: how the fat bodies of both the southern armyworm Spodoptera**

- eridania and the predator *Ceraeochrysa claveri* react to azadirachtin exposure.** *Protoplasma* 256, 839–856. 2019.
- SGOLASTRA, F. *et al.* **Duration of prepupal summer dormancy regulates synchronization of adult diapause with winter temperatures in bees of the genus *Osmia*.** *Journal of Insect Physiology*, v. 58, n. 7, p. 924–933, jul. 2012.
- SILVA, J. G. **A Nova Dinâmica da Agricultura Brasileira.** São Paulo: Editora da Unicamp, 1996.
- SILVA-ZACARIN, E. C. M., *et al.* **Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues:** application in histopathology of honey bee. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology.* Badajoz: Formatex Research Center, pp. 696–703, 2012.
- SINDIVÉG. **Setor de agroquímicos confirma queda de vendas.** Press release. São Paulo. Balanço, 2015.
- SKOWRONEK, P.; WÓJCIK, L.; STRACHECKA, A. **Fat Body:** Multifunctional Insect Tissue. *Insects.* 2021.
- SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. **Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil.** *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 10–18. 2011.
- TEIXEIRA, J. C. **Modernização da agricultura no Brasil:** impactos econômicos, sociais e ambientais. *Revista Eletrônica da Associação dos Geógrafos Brasileiros. Seção Três Lagoas.* v. 2, n. 2, 2005.
- THERNEAU, T. M. **Survival Analysis [R package survival version 3.3-1].** In: <https://cran.r-project.org/web/packages/survival/index.html>.
- THERNEAU, T. M. GRAMBSCH, P. M. **The Cox Model 3.1 Introduction and Notation Model. Surviv. Data Extending Cox Model.** Springer, New York, 2000.
- TROSTLE, G. E. **Bee population returns and Cherry yields in an Orchard Pollinated with *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Mgeachilidae).** *Journal of Economic Entomology*, v. 99, n. 2, p. 408-413, 2006.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Guidance for Assessing Pesticide Risks to Bees.** 2014.
- VIDAL, B. C. **Dichroism on collagen bundles stained with Xylidine ponceau 2R.** *Ann Histochem.* 1970.
- VOGEL, S. **Ölblumen und ölsammelnde Bienen.** *Akad. Wiss. u. Lit., math.-nat. Kl., Tropische und subtropische Pflanzenwelt* 7: 285-547. 1974.

XAVIER, W. P. *et al.* **Produção de biopesticidas para o controle ecológico de pragas agrícolas em hortas orgânicas.** Revista Brasileira de Agricultura Irrigada, v. 12, n. 4, p. 2808-2813, 2018.