

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

Rebeca Emanuelle da Silva Castor

**TOXICIDADE DO INSETICIDA FLUPIRADIFURONA NO CÉREBRO E
INTESTINO DE *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (HYMENOPTERA, APIDAE,
MELIPONINI) E SEUS EFEITOS COMPORTAMENTAIS**

Sorocaba

2025

Rebeca Emanuelle da Silva Castor

**TOXICIDADE DO INSETICIDA FLUPIRADIFURONA NO CÉREBRO E
INTESTINO DE *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (HYMENOPTERA, APIDAE,
MELIPONINI) E SEUS EFEITOS COMPORTAMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva

Financiamento: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Sorocaba

2025

Castor, Rebeca Emanuelle da Silva

Toxicidade do inseticida flupiradifurona no cérebro e intestino de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e seus efeitos comportamentais / Rebeca Emanuelle da Silva Castor -- 2025.
100f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Elaine Cristina Mathias da Silva
Banca Examinadora: Eliane Pintor de Arruda, Osmar Malaspina
Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Abelhas sem ferrão. 3. Flupiradifurona. I. Castor, Rebeca Emanuelle da Silva. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

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

REBECA EMANUELLE DA SILVA CASTOR

**TOXICIDADE DO INSETICIDA FLUPIRADIFURONA NO CÉREBRO E INTESTINO DE
Scaptotrigona postica (LATREILLE, 1807) (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI) E
SEUS EFEITOS COMPORTAMENTAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental. Sorocaba, 27 de fevereiro de 2025.

Orientador(a)

Dr. (a) Elaine Cristina Mathias da Silva

Universidade Federal de São Carlos - *campus Sorocaba*

Examinador(a)

Dr. (a) Eliane Pintor de Arruda

Universidade Federal de São Carlos - *campus Sorocaba*

Examinador(a)

Dr. Osmar Malaspina

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - campus Rio Claro



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Rebeca Emanuelle da Silva Castor, realizada em 27/02/2025.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Osmar Malaspina (UNESP)

Profa. Dra. Eliane Pintor de Arruda Moraes (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Dedico a Deus, por todo cuidado e sabedoria.

Aos meus pais, pelo apoio e amor em todos os momentos.

E a minha irmã pelo incentivo incondicional.

AGRADECIMENTO

Eu agradeço imensamente,

A Deus, pela força, sabedoria e saúde que me permitiram trilhar este caminho.

Aos meus pais, Ana Maria e Renildo, por todo o amor, apoio e por acreditarem em mim incondicionalmente, independente das circunstâncias. Vocês sempre foram, são e serão minha maior inspiração e motivação.

À minha irmã, Ana Raquel, pela companhia, pelas palavras de encorajamento e por estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Elaine C. Mathias, pelo suporte, paciência e orientação fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Sua dedicação e conhecimento foram essenciais para que eu pudesse superar os desafios ao longo dessa jornada.

Às minhas amigas e aos meus amigos, pelo carinho, risadas e por estarem sempre prontos para me apoiar. A amizade de vocês tornou esse percurso mais leve e especial.

Às minhas colegas do NuPECA, Kyl e Rafaela, pelos ensinamentos, treinamentos e pela ajuda constante nas atividades do laboratório.

Ao meu colega de mestrado, Raphael, pela parceria nos estudos, troca de conhecimentos e apoio durante essa jornada.

Ao meu colega do NuPECA, Vinícius, pelo auxílio durante as análises histológicas.

E aos demais colegas do NuPECA, pela parceria e pelo compartilhamento de conhecimento.

Trabalhar ao lado de vocês tornou essa experiência acadêmica ainda mais enriquecedora.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta trajetória, seja com palavras de incentivo, seja com gestos de apoio e compreensão. Muito obrigada!

RESUMO

CASTOR, Rebeca Emanuelle da Silva. Toxicidade do inseticida flupiradifurona no cérebro e intestino de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) e seus efeitos comportamentais. 2024. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2024.

As abelhas são importantes e eficientes polinizadores de espécies vegetais silvestres e agrícolas, porém a população desses polinizadores vem sofrendo um declínio ao redor do mundo. Entre os diferentes fatores estressores responsáveis por essa diminuição, está o uso indiscriminado dos agrotóxicos. O flupiradifurona, um agrotóxico liberado há poucos anos no Brasil, foi desenvolvido como uma alternativa mais segura e menos tóxica do que os inseticidas neonicotínoídeos para o meio ambiente e organismos não-alvo, como as abelhas. Porém, ainda é necessário compreender os efeitos fisiológicos e comportamentais dessa substância em abelhas nativas, já que maioria dos estudos com esse agrotóxico utiliza a abelha *Apis mellifera*. Com a finalidade de compreender os efeitos do flupiradifurona nas abelhas nativas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de uma exposição oral crônica a uma concentração ambientalmente relevante do flupiradifurona na sobrevivência e no comportamento de locomoção de *Scaptotrigona postica*, além de compreender os impactos desse inseticida no cérebro e intestino das abelhas. Para realização do bioensaio de sobrevivência, as abelhas foram alimentadas com xarope de sacarose 50% m/m contendo o inseticida (grupo exposto) e somente o xarope sem o inseticida (grupo controle) até a morte do último indivíduo. Para avaliação histopatológica e comportamental, as abelhas forrageiras de *S. postica* foram expostas ao flupiradifurona durante 7 dias e, após esse período, indivíduos do grupo exposto e controle foram submetidos a dissecação para obtenção dos órgãos e outros indivíduos foram submetidos a filmagem em arena. Observou-se que a presença do flupiradifurona não interfere na sobrevivência das abelhas, de modo que os indivíduos dos grupos controle e exposto sobreviveram por tempo semelhante. Porém, o inseticida é responsável pela redução no comportamento de locomoção das abelhas, o que pode comprometer as tarefas desempenhadas pelas forrageiras na colônia. Essa alteração comportamental pode ser explicada pelo impacto do inseticida na disposição das células de Kenyon (compactadas e internas) que compõem a parte neuronal interna do cálice dos corpos pedunculados, que são responsáveis por funções cognitivas, como a plasticidade comportamental e aprendizagem associativa. A exposição ao agrotóxico aumentou entre 1,9 - 2 vezes a distância entre as células de Kenyon. Em contrapartida, o flupiradifurona não afetou negativamente a morfologia do intestino médio das abelhas. Portanto, em condições

laboratoriais, o inseticida flupiradifurona tem interferência nas células de Kenyon, que potencialmente resultam nas alterações comportamentais. No entanto, esses efeitos adversos não têm interferência na sobrevivência das abelhas, mas podem afetar indiretamente a performance das atividades das forrageiras no interior da colônia após a coleta de recursos florais no campo.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão; agrotóxico; neurotoxicidade; digestão; sobrevivência.

ABSTRACT

CASTOR, Rebeca Emanuelle da Silva. Toxicity of the insecticide flupyradifurone in the brain and intestine of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) and its behavioral effects. 2024. Dissertation (Master's Degree in Biotechnology and Environmental Monitoring) - Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2024.

Bees are important and efficient pollinators of wild and agricultural plant species, but the population of these pollinators has been declining around the world. Among the various stressors responsible for this decline is the indiscriminate use of pesticides. Flupyradifurone, a pesticide released a few years ago in Brazil, was developed as a safer and less toxic alternative to neonicotinoid insecticides for the environment and non-target organisms such as bees. However, it is still necessary to understand the physiological and behavioral effects of this substance on native bees, since most studies with this pesticide use the *Apis mellifera* bee. In order to understand the effects of flupyradifurone on native bees, this study aimed to evaluate the influence of chronic oral exposure to an environmentally relevant concentration of flupyradifurone on the survival and locomotion behavior of *Scaptotrigona postica*, as well as to understand the impacts of this insecticide on the bees' brains and intestines. To carry out the survival bioassay, the bees were fed 50% m/m sucrose syrup containing the insecticide (exposed group) and only the syrup without the insecticide (control group) until the last individual died. For histopathological and behavioral evaluation, *S. postica* forager bees were exposed to flupyradifurone for 7 days and, after this period, individuals from the exposed and control groups were dissected to obtain organs and the individuals were filmed in the arena. It was observed that the presence of flupyradifurone does not interfere with bee survival, so that individuals from the control and exposed groups survived for a similar length of time. However, the insecticide is responsible for reducing the bees' locomotion behavior, which can compromise the tasks performed by the foragers in the colony. This behavioral change can be explained by the impact of the insecticide on the arrangement of the Kenyon cells (compacted and internal) that make up the internal neuronal part of the calyx of the pedunculated bodies, which are responsible for cognitive functions such as behavioral plasticity and associative learning. Exposure to the pesticide increased the distance between the Kenyon cells by between 1.9 and 2 times. In contrast, flupyradifurone did not negatively affect the morphology of the bees' midgut. Therefore, under laboratory conditions, the insecticide flupyradifurone interferes with Kenyon cells, potentially resulting in behavioral changes.

However, these adverse effects do not interfere with bee survival, but may indirectly affect the performance of foraging activities within the colony after collecting floral resources in the field.

Keywords: stingless bees; pesticides; neurotoxicity; digestion; survival.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Abelhas das famílias que ocorrem no Brasil | 24 |
| Figura 2 – Abelha <i>Scaptotrigona postica</i> | 25 |
| Figura 3 – Parasita forídeos encontrados em abelhas..... | 26 |
| Figura 4 – Diferenças na estrutura química entre neonicotinoides (imidacloprido) e butenólidos (flupiradifurona)..... | 28 |
| Figura 5 – Estrutura química do inseticida flupiradifurona pertencente a classe butenolida - 4-[(6-cloro-3-piridilmetil)(2,2-difluoroetil)amino]furan-2(5H)-ona..... | 29 |
| Figura 6 – Sistema nervoso das abelhas, baseado em <i>Apis mellifera</i> | 32 |
| Figura 7 – Estruturas do cérebro das abelhas, baseado em <i>Apis mellifera</i> | 33 |
| Figura 8 – Representação do sistema digestório das abelhas..... | 34 |
| Figura 9 – Processo de coleta e aclimatação das abelhas <i>Scaptotrigona postica</i> | 41 |
| Figura 10 – Representação da produção da solução estoque e diluições seriadas..... | 42 |
| Figura 11 – Taxa de mortalidade das abelhas durante o período do ensaio piloto..... | 44 |
| Figura 12 – Descrição esquematizada da contagem do N_{final} do experimento de avaliação de sobrevivência de <i>Scaptotrigona postica</i> | 45 |
| Figura 13 – Arena de filmagem usada para avaliação dos parâmetros comportamentais de <i>Scaptotrigona postica</i> | 46 |
| Figura 14 – Etapas do protocolo de desidratação lenta gradativa..... | 48 |
| Figura 15 – Sobrevivência das abelhas ao longo do experimento, levando em consideração apenas os grupos experimentais..... | 51 |
| Figura 16 – Forídeos nas abelhas <i>S. postica</i> | 52 |
| Figura 17 – Consumo de alimento, em gramas, das abelhas ao longo do experimento (média \pm desvio padrão)..... | 53 |
| Figura 18 – Velocidade média, em centímetros por segundos, das abelhas <i>Scaptotrigona postica</i> | 54 |
| Figura 19 – Gráfico boxplot da média de velocidade das abelhas em diferentes colônias..... | 55 |
| Figura 20 – Distância total percorrida, em centímetros, pelas abelhas <i>Scaptotrigona postica</i> | 56 |

| | |
|---|----|
| Figura 21 – Mapa de calor de <i>Scaptotrigona postica</i> para os diferentes grupos experimentais e colônias nos dois blocos de repetição. Padrão de caminhada de alguns dos indivíduos filmados e frequência de sua posição na arena ao longo do tempo (t = 10 min)..... | 56 |
| Figura 22 – Gráfico boxplot da distância total percorrida pelas abelhas em diferentes colônias..... | 57 |
| Figura 23 – Tempo total de movimentação, em segundos, de <i>Scaptotrigona postica</i> | 58 |
| Figura 24 – Gráfico boxplot do tempo total de movimentação das abelhas em diferentes colônias..... | 59 |
| Figura 25 – Frequência de rotações de operárias forrageiras de <i>Scaptotrigona postica</i> | 59 |
| Figura 26 – Gráfico boxplot do tempo total de movimentação das abelhas em diferentes colônias..... | 60 |
| Figura 27 – Distância entre as células de Kenyon de <i>Scaptotrigona postica</i> (média ± desvio padrão)..... | 61 |
| Figura 28 – Cérebro de <i>Scaptotrigona postica</i> | 61 |
| Figura 29 – Score de alterações do intestino de <i>Scaptotrigona postica</i> (média ± desvio padrão)..... | 62 |
| Figura 30 – Alterações morfológicas observadas no intestino médio de <i>Scaptotrigona postica</i> | 63 |
| Figura 31 – Índices de lesão (IL) das alterações morfológicas de baixa importância patológica (média ± desvio padrão)..... | 65 |
| Figura 32 – Índices de lesão (IL) das alterações morfológicas de importância patológica moderada (média ± desvio padrão)..... | 66 |
| Figura 33 – Índices de lesão (IL) das alterações morfológicas de alta importância patológica (média ± desvio padrão)..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Parâmetros histológicos utilizados para análise semi-qualitativa dos danos no intestino médio de abelhas <i>Scaptotrigona postica</i> e o fator de importância correspondente..... | 49 |
| Tabela 2 – Tempo de longevidade e TL50 de <i>S. postica</i> durante o experimento..... | 51 |
| Tabela 3 – Consumo diário de alimento durante o experimento..... | 53 |
| Tabela 4 – Consumo total de alimento durante o experimento..... | 53 |
| Tabela 5 – Distância média entre as células de Kenyon dos corpos pedunculados (média ± desvio padrão)..... | 61 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Parâmetros comportamentais analisados e suas respectivas descrições, segundo o software Ethovision (Noldus) versão 1.5..... | 46 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C Controle

CE Comunidade Europeia

CTR Controle

E Exposto

EXP Exposto

FPF Flupiradifurona

GLM Modelos lineares generalizados

H.E. Hematoxilina-Eosina

HR Hazard Ratio

IC Intervalo de confiança

nAChRs receptores nicotínicos de acetilcolina

PAS Periódico de Schiff

UE União Europeia

UFSCar Universidade Federal de São Carlos

UNESP Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. OBJETIVOS | 21 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 21 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 21 |
| 3.1 ABELHAS..... | 21 |
| 3.1.1 Biologia e importância das abelhas | 22 |
| 3.1.2 Abelha nativa <i>Scaptotrigona postica</i> | 24 |
| 3.2 FATORES ESTRESSORES RELACIONADOS AO DECLÍNIO DE ABELHAS..... | 25 |
| 3.2.1 Ameaças ao bem-estar das abelhas | 25 |
| 3.2.2 Agrotóxicos | 27 |
| 3.2.3 Diferenças entre os agrotóxicos butenólidos e neonicotinoides nas abelhas | 27 |
| 3.2.3 Flupiradifurona | 29 |
| 3.3 SISTEMA NERVOSO: CÉREBRO..... | 31 |
| 3.4 SISTEMA DIGESTÓRIO: INTESTINO..... | 33 |
| 3.5 EFEITOS COMPORTAMENTAIS CAUSADOS PELO FLUPIRADIFURONA EM ABELHAS..... | 35 |
| 4. ARTIGO | 36 |
| 4.1 INTRODUÇÃO..... | 37 |
| 4.2 METODOLOGIA..... | 39 |
| 4.2.1 Coleta e manutenção das abelhas | 39 |
| 4.2.2 Definição da concentração do inseticida flupiradifurona | 41 |
| 4.2.3 Preparo das soluções e alimentos | 42 |
| 4.2.4 Determinação do tempo de exposição para análises histológica e comportamental | 43 |
| 4.2.5 Bioensaio de sobrevivência | 44 |
| 4.2.6 Bioensaio comportamental de locomoção | 45 |
| 4.2.7 Análises histológicas | 47 |
| 4.2.8 Análise estatística dos dados | 50 |
| 4.3 RESULTADO..... | 51 |
| 4.3.1 Sobrevivência | 51 |

| | |
|--|-----|
| 4.3.2 Análise comportamental | 53 |
| 4.3.2.1 Velocidade média..... | 53 |
| 4.3.2.2 Distância percorrida..... | 55 |
| 4.3.2.3 Tempo de movimentação..... | 57 |
| 4.3.2.4 Frequência de rotações..... | 59 |
| 4.3.3 Análise histológica | 60 |
| 4.3.3.1 Cérebro..... | 61 |
| 4.3.3.2 Intestino..... | 62 |
| 4.4 DISCUSSÃO..... | 66 |
| 4.5 CONCLUSÃO..... | 73 |
| 4.6 REFERÊNCIAS | 74 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 84 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 84 |
| 7. ANEXOS | 100 |

1 INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos que fazem parte da ordem Hymenoptera (Classe Insecta), um dos maiores grupos existentes entre os insetos (Grimaldi; Engel, 2005; Aguiar *et al.*, 2013), e possuem grande importância devido a sua eficiência na polinização (Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011; Silva; Paz, 2012); estima-se que há aproximadamente 20 mil espécies de abelhas distribuídas no mundo, compondo 4 mil gêneros, sendo que cerca de 15 mil espécies são encontradas na região neotropical do planeta (Freitas *et al.*, 2009; Santos; Carvalho; Silva, 2004). No Brasil, há aproximadamente 5.000 espécies de abelhas distribuídas em cinco famílias (Andrenidae, Halictidae, Apidae, Megachilidae e Colletidae) (Freitas *et al.*, 2009; Silveira; Melo; Almeida, 2002). A tribo Meliponini (família Apidae), por exemplo, é composta por abelhas sem ferrão (meliponídeos) e recebe esse nome devido ao ferrão ausente ou atrofiado (Michener, 2007). Essa tribo é nativa dos trópicos e subtropicais do planeta, e cerca de 80% das espécies descritas ocorrem no hemisfério ocidental, desde o México à Argentina (Ayala *et al.*, 2013).

Entre as espécies de abelhas sociais sem ferrão encontradas no Brasil está a *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), popularmente conhecida por mandaguari, essas abelhas vivem em ocos de árvores, podem chegar até 20.000 indivíduos na colônia e são encontradas desde o México ao Rio Grande do Sul (Brasil) (Embrapa, 2018; Nogueira-Neto, 1997). Como forma de defesa, enrolam nos pelos e cabelos dos organismos que apresentam ameaça (Embrapa, 2018). Além de ser responsável pela polinização de culturas como caju, maracujá, morango, pitanga, açaí, entre outras (Souza *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2020). De modo geral, as abelhas desempenham papel fundamental na polinização de espécies vegetais tanto em ecossistemas naturais quanto em culturas agrícolas (Nicholls; Altieri, 2013), atuando como polinizadores de quase 90% das plantas com flores pelo mundo (Cruz; Cruz; Campos, 2009; D'ávila; Marchini, 2005). Apesar de diferentes espécies de insetos atuarem como polinizadores de plantas específicas, as abelhas, manejadas e silvestres, ainda são as principais responsáveis pela polinização de culturas agrícolas pelo mundo (Klein *et al.*, 2020), sendo consideradas os polinizadores economicamente mais valiosos em todo o mundo (Mcgregor, 1976; Watanabe, 1994; Klein *et al.*, 2006).

Porém, as abelhas e outros grupos de insetos têm sido ameaçadas devido a diferentes fatores, sendo que a perda de habitat (Jaffé *et al.*, 2019), mudanças climáticas (Becker; Pequeno; Carvalho-Zilve, 2018; Jaffé *et al.*, 2019) e competição por recursos (Hung *et al.*,

2019) são algumas das causas da diminuição das populações desses insetos polinizadores. Além do que, a ação humana em conjunto com o uso inadequado dos agrotóxicos está entre os fatores com maior impacto na ameaça à biodiversidade desses animais (Dudley; Alexander, 2017). Devido à ação sistêmica de muitos agrotóxicos, e conseqüentemente à alta capacidade de permanecer no ambiente, essas substâncias têm apresentado grande ameaça para as abelhas (Freitas *et al.*, 2017).

Levando isso em consideração e a importância em garantir rendimentos sustentáveis dos plantios agrícolas (Godfray *et al.*, 2010), é necessária atenção no desenvolvimento e descoberta de novas substâncias sintéticas (Pisa *et al.*, 2021), pois já foi demonstrado que alguns agrotóxicos possuem efeitos nocivos para polinizadores, como as abelhas. Entre os efeitos já descritos há toxicidade crônica e aguda (Blacquièrre *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012; Tsvetkov *et al.*, 2017), que influencia no forrageamento (Gill; Rodrigues; Raine, 2012; Pilling *et al.*, 2013), saúde (Pilling *et al.*, 2013), desenvolvimento (Pilling *et al.*, 2013; Rundlöf *et al.*, 2015) e sobrevivência dos insetos (Gill; Rodrigues; Raine, 2012). O flupiradifurona, por exemplo, é um novo inseticida sistêmico, desenvolvido pela Bayer CropScience, que pertence ao grupo químico butenolidas. Semelhante aos neonicotinoides e sulfoximinas, esse inseticida atua sobre os nAChRs (Nauen *et al.*, 2014). É usado para controle de pragas agrícolas, como ácaros, pulgões e moscas-branca (Nauen *et al.*, 2014; Bayer, 2022). O registro do composto aconteceu em 2014, na Europa, e desde então foi registrado em mais de 50 países, incluindo Austrália, Brasil, China, Estados Unidos, Japão e Nova Zelândia (EFSA *et al.*, 2022). O flupiradifurona é usado em culturas como soja, café, citrus, algodão, cacau, lúpulo, maracujá, pimentão, berinjela, pimenta, além de plantas ornamentais (Nauen *et al.*, 2014; Bayer, 2022).

Apesar de ser considerado uma alternativa mais segura e menos tóxica ao ambiente, quando comparado a outros inseticidas, ainda é necessário compreender o real impacto do flupiradifurona aos polinizadores (Siviter *et al.*, 2024). Porém, segundo Lima *et al.* (2016), os estudos toxicológicos envolvendo espécies de abelhas sem ferrão são escassos, e geralmente estão relacionados a análises histopatológicas, sendo necessário mais estudos a respeito dos impactos dos inseticidas na relação e dinâmica das abelhas, além dos efeitos toxicológicos em nível subindividual. Além do que, a maioria dos estudos com o inseticida flupiradifurona foram realizados com *Apis mellifera* (Tan *et al.*, 2017; Tosi; Nieh, 2019; Coelho, 2021; Dorigo, 2022; López, Valadez-Moctezuma, Vargas-Hernández, 2023), porém há propensão da abelha nativa *Scaptotrigona postica* ter contato com essa substância durante a polinização de

culturas como citrus, maracujá e morango, onde esse inseticida é utilizado (Antonini; Costa; Bayer, 2022; Martins, 2006; Nauen *et al.*, 2014; Luz *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2015).

Além disso, sabendo que esse é um agrotóxico relativamente novo (Nauen *et al.*, 2014), ainda há efeitos desconhecidos sobre seus efeitos sobre insetos polinizadores. Sendo assim, o presente trabalho visa preencher lacunas no conhecimento a respeito dos efeitos do flupiradifurona em abelhas nativas sem ferrão, investigando a hipótese de que esse inseticida é menos tóxico para organismos não-alvo, como a abelha *S. postica*, quando comparado com os neonicotinoides. Devido a sua ação neurotóxica, os efeitos podem se manifestar no cérebro, especificamente nos corpos pedunculados, gerando impactos secundários, afetando a sobrevivência e comportamento de locomoção. A fim de compreender se o flupiradifurona cumpre o papel de ser um inseticida menos tóxico para organismos não-alvo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de uma exposição oral crônica a uma concentração ambientalmente relevante do inseticida flupiradifurona na longevidade e no comportamento de locomoção de *Scaptotrigona postica*, além dos impactos desse inseticida no cérebro e intestino de abelhas nativas sem ferrão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da exposição oral crônica ao inseticida flupiradifurona na longevidade de *S. postica*.
- Analisar os efeitos do inseticida no comportamento de locomoção de abelhas nativas sem ferrão.
- Investigar os impactos do inseticida nas células de Kenyon, localizadas nos corpos pedunculados do cérebro de *S. postica*.
- Investigar impactos do inseticida na morfologia do intestino médio de *S. postica*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ABELHAS

3.1.1 Biologia e importância das abelhas

As abelhas formam um grupo altamente diversificado dentro da ordem Hymenoptera, a qual inclui também às vespas e formigas (Grimaldi; Engel, 2005). Há aproximadamente 20.000 espécies de abelhas ao redor do mundo (Michener, 2007; Silva *et al.*, 2014), divididas em sete principais famílias (Apidae, Andrenidae, Colletidae, Halictidae, Megachilidae, Melittidae, Stenotritidae) (Michener, 2007). Essas apresentam diferentes comportamentos, morfologia e ecologia (Aguar *et al.*, 2013; Michener, 2007; Silva *et al.*, 2014). De modo que cada espécie, além de possuir características próprias, desempenham um papel particular na natureza (Silva *et al.*, 2014). Esses polinizadores apresentam diferentes níveis organizacionais, variando entre sociais, parassociais/quase-sociais e solitárias (Cardinal; Danforth, 2011; Silva *et al.*, 2014). As espécies classificadas como sociais apresentam ninhos com muitos indivíduos desempenhando diferentes funções e atividades ao longo da vida (Silva *et al.*, 2014 - Figura 1A), sendo divididos, de forma geral, em machos e fêmeas (rainha e operárias) (Silva *et al.*, 2014 - Figura 1B, C, D, E).

Em contrapartida, as abelhas solitárias não apresentam divisão de castas, uma única fêmea constroi sozinha o ninho, coleta e deposita alimento nas células de cria, oviposita, fecha as células e deixa o ninho (Silva *et al.*, 2014). Já as abelhas para-sociais, também chamadas de quase-sociais, não apresentam ninhos com muitos indivíduos ou divisão de castas bem definidas, mas não são solitárias e não abandonam o ninho logo após a construção (Silva *et al.*, 2014). Para a construção dos ninhos, de modo geral, as abelhas podem utilizar diferentes materiais, como madeira morta, areia, barro, folhas, pétalas de flores, óleos florais, resinas, entre outros (Pereira *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Elas se alimentam de recursos extraídos das flores, tendo grãos de pólen como principal fonte de proteína e sais minerais, néctar como principal fonte de carboidratos e óleos florais como a fonte mais importante de lipídios para as abelhas que coletam óleo (Silva *et al.*, 2014). Sendo que as abelhas podem apresentar uma dieta mais especializada, onde selecionam as plantas e recursos florais coletados, ou podem ser generalistas na escolha dos recursos alimentares (Michener, 2000).

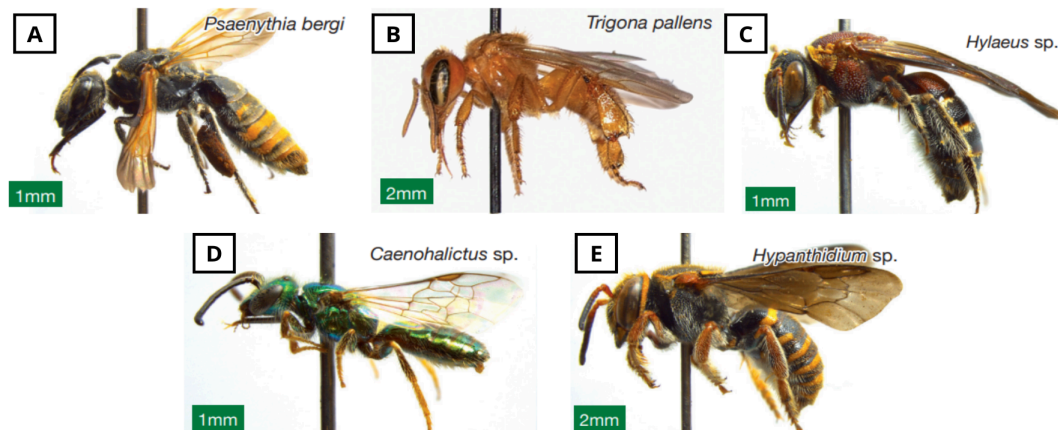
Cada grupo de abelhas apresenta adaptações morfológicas específicas, mas todas possuem uma estrutura básica semelhante composta por três partes principais, cabeça, tórax e abdômen (Calderone, 2012; Michener, 2007). Além disso, possuem o corpo coberto de cerdas, o que facilita a coleta de pólen, além de estruturas especializadas, essas estruturas

estão localizadas nas pernas posteriores podendo ser corbículas ou escopas, onde o pólen é armazenado durante o forrageamento (Michener, 2007; Silva *et al.*, 2014). Ademais, também são encontradas estruturas sensoriais responsáveis pela detecção de flores e comunicação (Michener, 2007).

Durante o forrageamento, ao visitar e coletar recursos florais, as abelhas desempenham um importante papel para as plantas, a polinização (Michener, 2007; Silva *et al.*, 2014; Witter *et al.*, 2014), na qual elas transferem grãos de pólen das estruturas masculinas (antras) para as estruturas femininas (estigma) das flores, em uma mesma planta (autopolinização) ou em plantas diferentes (polinização cruzada) (Witter *et al.*, 2014). Esse processo é importante porque promove a reprodução das plantas, e consequentemente a manutenção da base da cadeia alimentar nos ecossistemas (Michener, 2007; Silva *et al.*, 2014; Witter *et al.*, 2014). Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), as abelhas são responsáveis pela polinização de 73% das plantas cultivadas que são utilizadas direta ou indiretamente na alimentação humana (FAO, 2006). Sendo assim, manter e manejar as abelhas próximas de áreas de cultivo significa ter uma boa produção, frutos de qualidade, maior número de sementes e consequentemente mais lucros (Silva *et al.*, 2014).

Apesar da grande importância da relação entre polinizadores e produção agrícola, no Brasil, os serviços ecossistêmicos de polinização são pouco valorizados e estudados, de modo que não há estudos que abrangem completamente o valor econômico da polinização nos serviços agrícolas e/ou naturais (Freitas; Imperatriz-Fonseca, 2005). Como uma forma de reduzir os impactos causados pela perda dos polinizadores, o Brasil tem feito esforços para utilizar polinizadores nativos em algumas culturas, entre as espécies mais utilizadas estão as abelhas não-sociais *Centris* e *Xylocopa*, e espécies de Meliponini (Witter *et al.*, 2014). No Brasil, há aproximadamente 2500 espécies de abelhas nativas distribuídas em cinco famílias (Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae, Megachilidae - Figura 1A, B, C, D, E).

Figura 1 - Abelhas das famílias que ocorrem no Brasil. (A) Andrenidae. (B) Apidae. (C) Colletidae. (D) Halictidae. (E) Megachilidae.



Fonte: Silva *et al.*, 2014. Fotos de Kátia Aleixo.

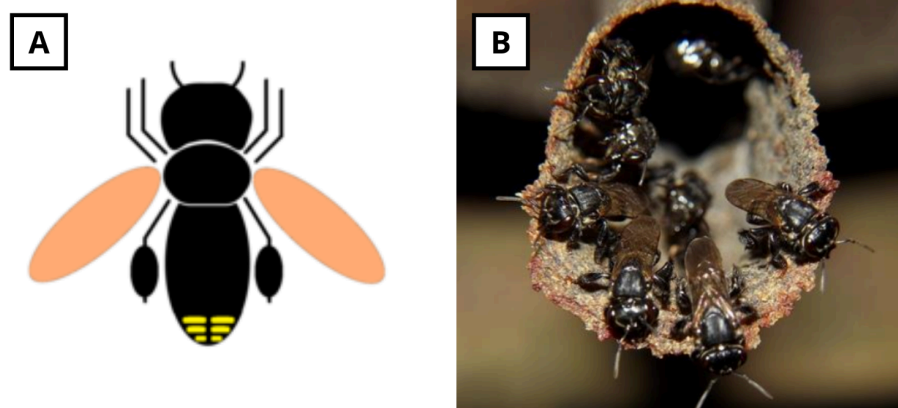
Entre as espécies de abelhas estão as abelhas sem ferrão, também chamadas de meliponídeos, caracterizadas por possuírem um ferrão atrofiado ou inexistente (Silveira; Melo; Almeida, 2002). Essas são abelhas sociais encontradas, na família Apidae, especificamente na tribo Meliponini, com, aproximadamente, 30 gêneros e 300 espécies identificadas (Kerr, 1996; Kerr; Carvalho; Nascimento, 1996; Silveira; Melo; Almeida, 2002; Pereira *et al.*, 2012). Mundialmente, sua distribuição ocorre na América do Sul, América Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África (Pereira *et al.*, 2012; Roubik, 1989). No Brasil, são encontradas em todas as regiões (Moure; Urban; Melo, 2007), sendo responsáveis pela polinização de 30% da vegetação da caatinga e pantanal, e cerca de 90% das plantas da Mata Atlântica (Kerr *et al.*, 2001). Quando comparadas às abelhas melíferas, são menos defensivas, possuem menor tamanho populacional e menor amplitude de voo durante o forrageamento (Witter *et al.*, 2014).

3.1.2 Abelha nativa *Scaptotrigona postica*

Scaptotrigona postica (Latreille, 1807), também conhecida como mandaguari ou mandaguari preta, é uma espécie de abelha nativa sem ferrão encontrada em países de clima tropical e subtropical, tendo maior ocorrência na América Latina (Nogueira-Neto, 1997). Foi descrita pela primeira vez em 1804 por Johann Christian Fabricius em um trabalho onde detalhou várias espécies de Hymenoptera (Fabricius, 1804). Essas abelhas possuem abdômen preto com listras amarelas e asas douradas (Embrapa, 2018 - Figura 2A). No Brasil, são encontradas nas florestas tropicais e subtropicais, onde formam colônias robustas, em relação

ao número de indivíduos, e são importantes polinizadores ecológicos (Embrapa, 2018; Nogueira-Neto, 1997 - Figura 2B). Possuem o hábito de nidificar em ocos de árvores a fim de proteger seus ninhos, e para isso, enrolam nos pelos e cabelos dos predadores (Embrapa, 2018). São comumente encontradas nos estados Bahia, Ceará, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Pernambuco, Paraná, Piauí, São Paulo, Santa Catarina e Sergipe, onde possui grande importância econômica local, devido a produção de mel e própolis, além de ser um importante polinizador de plantas nativas (Embrapa, 2018).

Figura 2 - Abelha operária *Scaptotrigona postica*. (A) Ilustração do corpo da abelha operária. (B) Entrada de uma colônia.



Fonte: A: <<https://www.biodiversity4all.org/taxa/418525-Scaptotrigona-postica>>, data de acesso: 30 set. 2024. B: Embrapa, 2018.

A mandaguari é uma espécie de abelha social da tribo Trigonini, que vive em colônias que podem chegar a 2.000 indivíduos ou mais, onde exalam um odor característico, que lembra óleo de coco (Embrapa, 2018). Assim como outras abelhas sociais, a rainha é responsável por gerar novos indivíduos, as operárias devem realizar a manutenção e defesa da colônia (Santos; Cruz-Landim, 2002), e os machos acasalam com a rainha (Nogueira-Neto, 1997), além de poder realizar outras tarefas como defesa do ninho (Kerr; Cunha, 1990). São responsáveis pela polinização de culturas como caju, maracujá, morango, pitanga, açaí, citrus, entre outras (Souza *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2020).

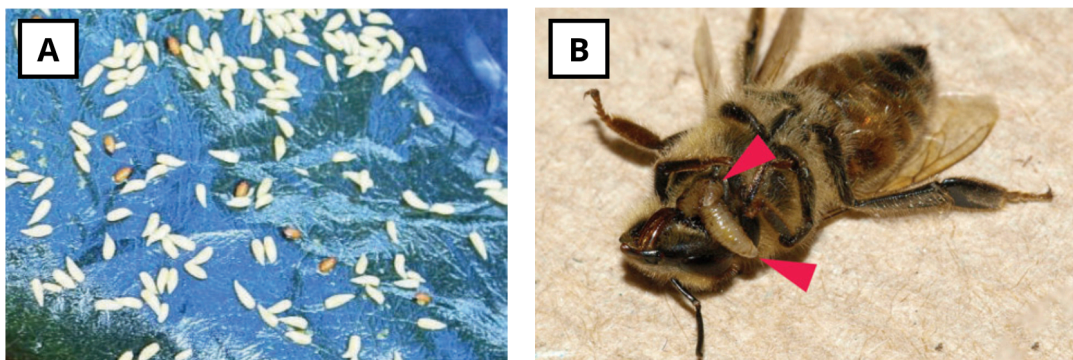
3.2 FATORES ESTRESSORES RELACIONADOS AO DECLÍNIO DAS POPULAÇÕES DE ABELHAS

3.2.1 Ameaças à saúde das abelhas

Apesar da grande importância das abelhas (Silva *et al.*, 2014; Witter *et al.*, 2014), atualmente, uma série de fatores estão levando ao declínio e desaparecimento das populações desses polinizadores (Goulson *et al.*, 2015), entre esses fatores, existe a destruição total ou parcial de áreas naturais próximas dos cultivos agrícolas (Potts *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2014), parasitas (Goulson *et al.*, 2015), doenças (Goulson *et al.*, 2015), agrotóxicos (Goulson *et al.*, 2015), dietas pobres em nutrientes (Goulson *et al.*, 2015), competição (Goulson *et al.*, 2015; Potts *et al.*, 2010), entre outros. Vale lembrar que, esses estressores não agem de forma isolada na natureza, é comum que haja ação simultânea de dois ou mais fatores (Goulson *et al.*, 2015). Por exemplo, a exposição a agrotóxicos pode prejudicar mecanismos de desintoxicação e respostas imunológicas das abelhas, tornando mais fácil a ação de parasitas, o que leva ao declínio populacional (Goulson *et al.*, 2015).

Vale destacar os parasitas, os quais são inimigos naturais das abelhas, mas podem se espalhar e se tornar uma ameaça, principalmente, quando as colônias estão fracas e desprotegidas (Embrapa, 2021). Os principais parasitas dos ninhos das abelhas sem ferrão são os forídeos, formigas, a mosca-soldado-negro, ácaros e outras abelhas (Pereira *et al.*, 2012). A maioria desses parasitas são atraídos pelo cheiro do mel e/ou pólen, atacam a colônia, de modo que, podem levar à morte ou redução no número de indivíduos (Cella; Cunha, 2020; Embrapa, 2021; Pereira *et al.*, 2012). Vale ressaltar a presença dos forídeos, que são pequenas moscas, pertencentes a família Phoridae (Diptera), que botam seus ovos no pólen estocado nas colônias e/ou no abdômen das abelhas (Embrapa, 2021). Após a eclosão, as larvas consomem os alimentos proteicos da colmeia, incluindo as crias, além disso, pode levar a morte do indivíduo, caso sua eclosão aconteça no corpo da abelha (Embrapa, 2021; Pereira *et al.*, 2012 - Figura 3).

Figura 3 - Parasita forídeo encontrado em abelhas sem ferrão. (A) Larvas de forídeo. (B) Larvas eclodidas no tórax de uma abelha, evidenciadas pela seta vermelha.



Fonte: A: Cella; Cunha, 2020. B: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Two_final_instar_larvae_of_Apocephalus_borealis_exiting_a_honey_bee_worker_at_the_junction_of_the_head_and_thorax.png>, data de acesso: 07 ago 2024. Foto de John Hafernik.

3.2.2 Agrotóxicos

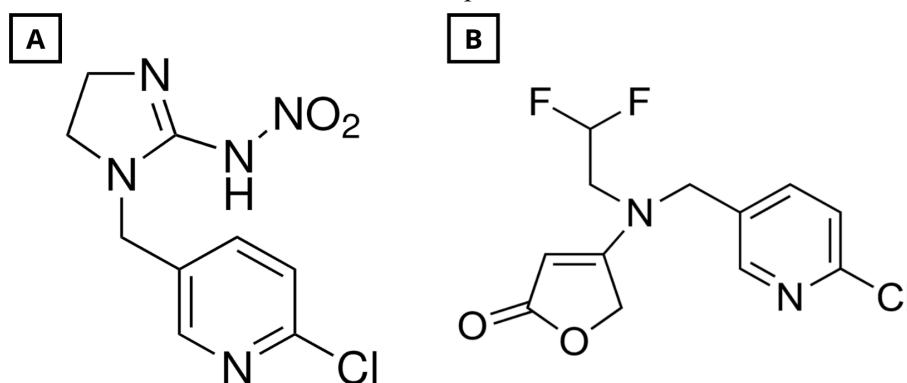
O declínio das abelhas causado pelos agrotóxicos é amplamente discutido, já que quando usados corretamente, os agrotóxicos proporcionam grandes benefícios econômicos derivados da agricultura (Goulson *et al.*, 2015), em contrapartida, o uso exacerbado e/ou incorreto pode contaminar os alimentos e a água (Cella; Cunha, 2020). Apesar disso, estudos já demonstraram a alta toxicidade de diferentes agrotóxicos para as abelhas, onde cento e sessenta e um tipos de agrotóxicos já foram detectados em colônias (Chauzat *et al.*, 2006; Goulson *et al.*, 2015; Sanchez-Bayo; Goka, 2014). Além disso, alguns neonicotinoides (tiametoxam, imidacloprido e clotianidina) apresentaram grande risco para as abelhas em escala mundial (Sanchez-Bayo; Goka, 2014; Goulson *et al.*, 2015). Já é de conhecimento geral que, as abelhas são expostas de forma crônica a diversos agrotóxicos ao longo do seu desenvolvimento e vida adulta (Goulson *et al.*, 2015; Krupke *et al.*, 2012; Mullin *et al.*, 2010; Paradis *et al.*, 2013; Sanchez-Bayo; Goka, 2014), porém os efeitos subletais causados por essas substâncias não são examinados pelos atuais procedimentos regulamentadores dos agrotóxicos (Goulson *et al.*, 2015; Regulamento (CE) nº 1107/2009).

3.2.3 Diferenças entre os agrotóxicos butenólidos e neonicotinoides nas abelhas

Os agrotóxicos butenólidos e neonicotinoides são classes de inseticidas sistêmicos usados em diferentes partes do mundo (EFSA *et al.*, 2022; Jeschke; Nauen, 2008; Nauen *et al.*, 2014; Nauen; Bretschneider, 2002 - Figura 4). Os neonicotinoides são uma das classes de agrotóxicos mais vendidos no mundo devido a diferentes fatores como versatilidade, persistência na planta e possíveis usos em diferentes atividades (agrícola e veterinário) (Jeschke; Nauen, 2008; Nauen; Bretschneider, 2002). Devido a sua ação sistêmica, esses inseticidas são persistentes no ambiente, se espalham por toda a planta, chegando ao néctar e pólen, além da possibilidade de atingir outras flores próximas das culturas em que são utilizados (Goulson *et al.*, 2015; Krupke *et al.*, 2012). Já o butenólido é uma classe de inseticida que teve seus primeiros registros comerciais na América Central (Guatemala e Honduras) em abril de 2014, e é classificado pelo sistema de classificação de modo de ação

do IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) como um novo subgrupo químico (butenólidos) (Nauen *et al.*, 2014). Foi aprovado pela União Europeia em 2015, onde passou a ser utilizado em países como França e Países Baixos (Regulamento (CE) n° 1107/2009; Regulamento (EU) 2015/2084 de 18 novembro de 2015). Assim como outros agrotóxicos sistêmicos, após a aplicação dos butenólidos, esses são absorvidos pelas plantas e distribuídos por todo o organismo vegetal (Nauen *et al.*, 2014).

Figura 4 - Diferenças na estrutura química entre neonicotinoides (imidacloprido) e butenólidos (flupiradifurona). (A) Estrutura química de um neonicotinoide, o inseticida imidacloprido. (B) Estrutura química de um butenólido, o inseticida flupiradifurona.



Fonte: (A) <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/imidaclopride?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=Imidaclopride&type=product>>. Data de acesso: 14 ago. 2024. (B) <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/flupyradifurone?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=Flupyradifurone&type=product>>. Data de acesso: 21 ago. 2024.

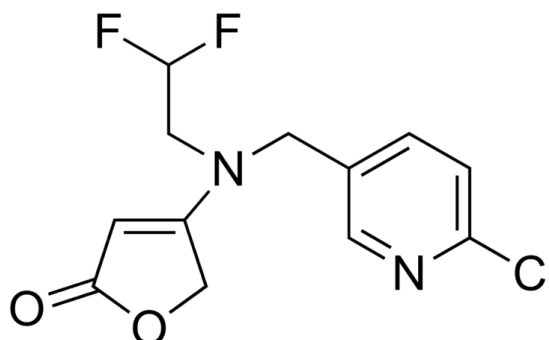
Ambos são inseticidas neurotóxicos que afetam o sistema nervoso central do inseto e possuem modo de ação semelhante (Nauen *et al.*, 2014; Tomizawa; Casida, 2005). Os neonicotinoides possuem alta afinidade por subtipos específicos de receptores de acetilcolina pós-sináptica (nAChRs), onde se ligam e causam superestimulação, paralisia e morte (Tomizawa; Casida, 2005). Os butenólidos também atuam como agonistas de nAChR (Nauen *et al.*, 2014), porém apresenta afinidade a uma ampla gama de subtipos de receptores, incluindo alguns que os neonicotinoides não atuam de forma eficiente, interferindo na transmissão dos impulsos nervosos, levando a paralisia e, eventualmente, a morte (Casida, 2018; Madesh *et al.*, 2024; Nauen *et al.*, 2014). Ao contrário dos neonicotinoides, que possuem uma ligação prolongada que causa superativação dos receptores, resultando em despolarização intensa e sustentada da membrana neuronal (Casida, 2018; Tomizawa; Casida, 2005), os butenólidos atuam como um agonista parcial, causando uma despolarização menos intensa, levando a redução da perda de eficiência (Madesh *et al.*, 2024; Nauen *et al.*, 2014).

Em doses e concentrações subletais, os neonicotinoides podem não causar a morte imediata de polinizadores, como as abelhas, mas pode alterar as atividades de forrageamento, aprendizagem olfatória e atividade motora (Silva *et al.*, 2016), além de provocar mudanças no comportamento dos indivíduos (Bortolotti *et al.*, 2003; Medrzycki *et al.*, 2003). Efeitos semelhantes também foram vistos em estudos com inseticida butenólido, onde a eficiência de forrageamento das abelhas foi comprometida (Hesselbach; Scheiner, 2019; Siviter *et al.*, 2024) e o desenvolvimento larval foi afetado (Dorigo, 2022), entre outros efeitos. Mas em comparação com outros agonistas de nAChR já comercializados, como acetamiprida, imidacloprido, clotianidina e tiametoxam, o butenólido flupiradifurona possui um sistema farmacofórico diferente com um novo andaime bioativo (Nauen *et al.*, 2014). Tendo um perfil toxicológico e ecotoxicológico mais seguro e favorável para aplicações foliares, de drenagem e tratamento de sementes, especialmente para insetos-praga sugadores (Nauen *et al.*, 2014).

3.2.3 Flupiradifurona

O flupiradifurona, que faz parte do grupo químico butenolida, é um inseticida desenvolvido como resultado de pesquisas sobre novas substâncias que pudessem dar origem a novas classes químicas de agrotóxicos (Nauen *et al.*, 2014 - Figura 5). Esse inseticida é produzido a partir de um produto natural chamado stemofolina, o qual é isolado de folhas e caules da planta medicinal oriental *Stemona japonica* (Stemonaceae) (Nauen *et al.*, 2014; Yamamoto; Casida, 1999). Tendo em vista que a stemofolina é um agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina de insetos (nAChRs), apesar de apresentar eficácia inferior quando comparada com inseticidas comerciais existentes (Nauen *et al.*, 2014; Yamamoto; Casida, 2018), sua ação foi considerada um ponto de partida para o desenvolvimento de um novo inseticida (Nauen *et al.*, 2014).

Figura 5 - Estrutura química do inseticida flupiradifurona pertencente a classe butenolida - 4-[(6-cloro-3-piridilmetil)(2,2-difluoroetil)amino]furan-2(5H)-ona.



Fonte: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/search/flupyradifurone?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=Flupyradifurone&type=product>>. Data de acesso: 21 ago. 2024.

A partir desses estudos, a Bayer criou o Sivanto Prime® que tem como ingrediente ativo o flupiradifurona (Bayer, 2022a; Nauen *et al.*, 2014). Esse é um inseticida sistêmico que age no sistema nervoso do inseto, sendo uma promessa para controle do psilídeo, vetor do *greening*, praga que atingiu cerca de um quarto das laranjeiras do cinturão citrícola do Brasil em 2022 (Fundecitrus, 2022), além de outras pragas como pulgões, cigarrinhas, cochonilhas, moscas, traças, mirídeos e tripes (Nauen *et al.*, 2014). Segundo a Bayer (2021), esse é um produto exclusivo, não existindo outro semelhante no mercado, sendo resultado de uma pesquisa de quase 15 anos. O Sivanto pode ser usado em diferentes tipos de culturas, como alface, algodão, aveia, batata, centeio, cevada, café, citrus, feijão, maçã, entre outras (Bayer, 2022). De modo geral, esse é um inseticida que atua como agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) das células nervosas nos insetos, semelhante aos neonicotinoides, ou seja, o flupiradifurona se liga a esses receptores provocando a ativação prolongada dos canais de sódio, permitindo um fluxo contínuo de íons de sódio para dentro das células neuronais, o que leva a hiperatividade neuronal, e conseqüentemente, a morte (Nauen *et al.*, 2014). Possui ação rápida e eficaz, o que torna esse inseticida uma ótima opção para ser usado em pragas resistentes (Nauen *et al.*, 2014).

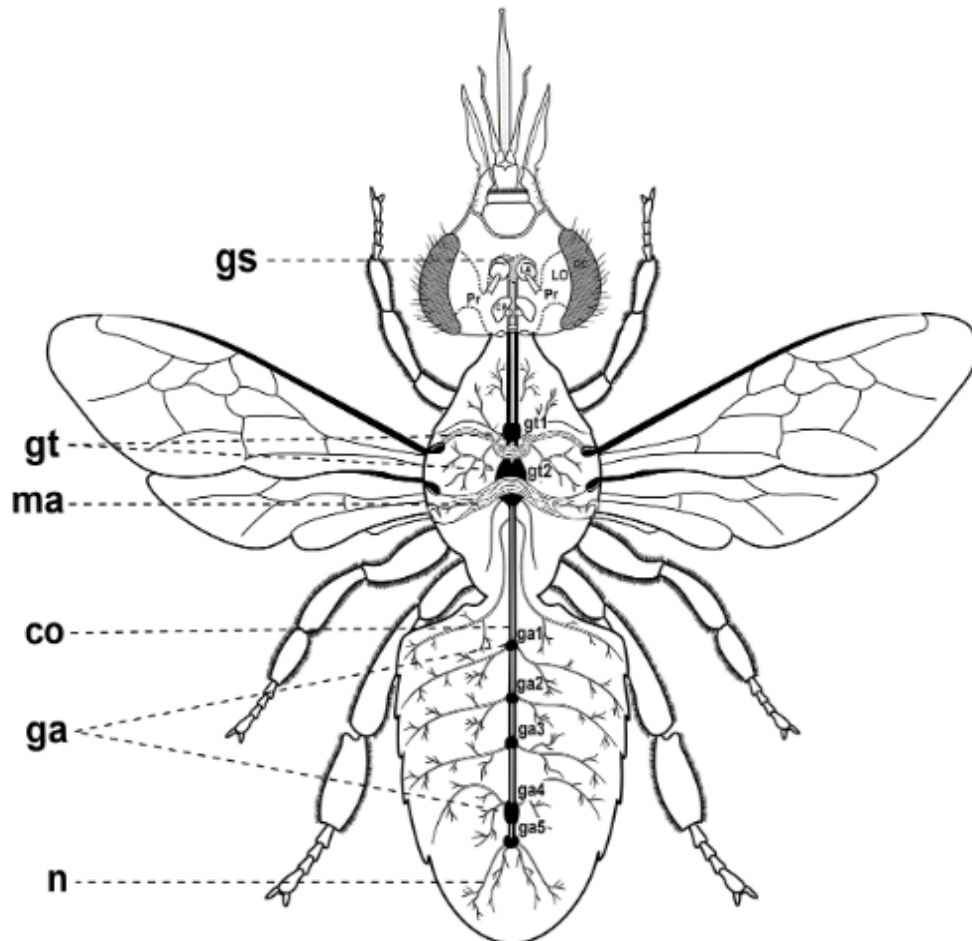
Apesar de ser considerado mais seguro e menos tóxico, quando comparado com os neonicotinoides (Nauen *et al.*, 2014), em 2020 as autoridades francesas (artigo 69 do Regulamento (CE) n° 1107/2009) solicitaram a proibição da venda e utilização do flupiradifurona e do acetamiprido devido aos riscos para saúde humana e ambiental que essas substâncias podem gerar (EFSA *et al.*, 2022). Para isso, a França e os Países Baixos forneceram provas científicas, estudos e pesquisas, a fim de apoiar esse pedido (EFSA *et al.*, 2022). Além do que, a partir do seu lançamento, em 2014 (Nauen *et al.*, 2014), diversos estudos usando abelhas foram realizados a fim de compreender a ação desse inseticida em organismos não-alvo, de modo que, foi observado que o flupiradifurona pode reduzir o sucesso de nidificação (Siviter *et al.*, 2024), comprometer a eficiência de forrageamento (Hesselbach; Scheiner, 2019; Siviter *et al.*, 2024), aumentar a mortalidade (Al Naggar; Baer, 2019; Hesselbach; Scheiner, 2019; Siviter *et al.*, 2024; Tong; Nieh; Tosi, 2019), afetar o desenvolvimento das larvas (Dorigo, 2022), alterar a expressão de genes imunológicos e de desintoxicação (Al Naggar; Baer, 2019), entre outros efeitos.

3.3 SISTEMA NERVOSO: CÉREBRO

A *Apis mellifera* é usada como modelo para diferentes estudos ecotoxicológicos sobre abelhas, inclusive para descrever o padrão do sistema nervoso desses polinizadores (Azevedo; Nocelli, 2020). Sendo assim, a organização e funcionamento do sistema nervoso de *Apis mellifera* e as demais abelhas é semelhante ao encontrado nos insetos em geral (Azevedo; Nocelli, 2020; CHMIEL *et al.*, 2020), sendo composto pelo sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (Cruz-Landim, 2009). O SNC é responsável pelo processamento de todas as informações que são recebidas pelo corpo, e o SNP tem função sensorial, e está diretamente envolvido na captação dos estímulos ambientais, os elementos principais de ambos os sistemas são as células nervosas (neurônios), que são derivadas da ectoderme e responsáveis pela percepção e condução de estímulos (Cruz-Landim, 2009). Além dos neurônios, às células da glia também merecem destaque, essas são células de sustentação do tecido, de modo que se arranjam aos neurônios e formam os gânglios (Azevedo; Nocelli, 2020; Edenfeld; Stork; Klämbt, 2005; Hählein *et al.*, 1987; Oland; Tolbert, 2003).

O SNC das abelhas é composto pelo cérebro e pelo sistema estomogástrico, localizados na cabeça, e pela cadeia nervosa central, que se entende ao longo do corpo (Cruz-Landim, 2009 - Figura 6). Já o SNP é constituído por nervos e suas ramificações, pelos neurônios sensoriais, localizados nas extremidades do corpo, e pelos órgãos dos sentidos (Cruz-Landim, 2009 - Figura 6). Devido ao complexo sistema nervoso, insetos como as abelhas possuem alta capacidade cognitiva de aprendizagem e memorização que, quando aliadas ao comportamento social, de algumas espécies, tornam as abelhas excelentes modelos neurobiológicos (Azevedo; Nocelli, 2020; Roat; Cruz-Landim, 2011).

Figura 6 - Sistema nervoso das abelhas, baseado em *Apis mellifera*. Cabeça - CC: corpo central; CP: corpo pedunculado; gs: gânglio subesofageano; LA: lobo antenal; LO: lobo óptico; OC: olho composto; Pr: protocérebro. Tórax – gt: gânglio torácico; gt1: gânglio torácico 1; gt2: gânglio torácico 2; ma: músculo alar. Abdômen – co: conectivos; ga: gânglio abdominal; ga1: gânglio abdominal 1; ga2: gânglio abdominal 2; ga3: gânglio abdominal 3; ga4: gânglio abdominal 4; ga5: gânglio abdominal 5; n: nervos.

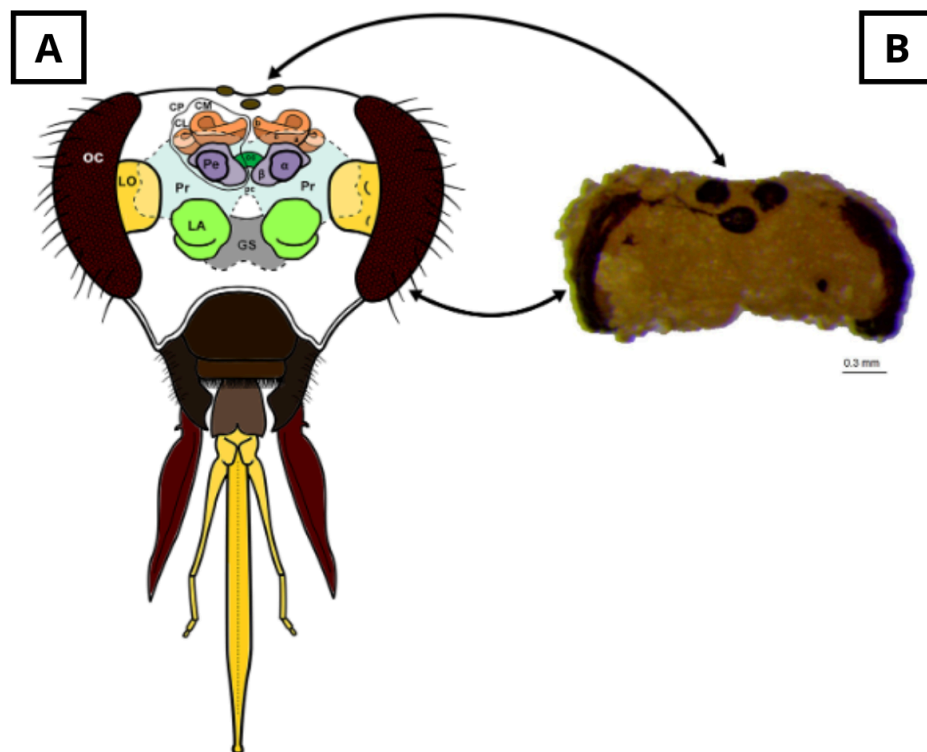


Fonte: Azevedo; Nocelli, 2020.

Em estudos neurotoxicológicos, as pesquisas são focadas no cérebro, devido à centralidade nas funções cognitivas, comportamentais, e demais funções desse órgão (Azevedo; Nocelli, 2020). O cérebro é composto pela fusão de três gânglios: o protocérebro, associado ao processamento visual e coordenação motora; o deutocérebro, que está relacionado aos estímulos olfatórios; e o tritocérebro, responsável por controlar os movimentos peristálticos. E cada um é constituído por regiões com corpos celulares, ou soma de neurônios (somata) e por regiões com prolongamentos (neurópila), além de outros compostos (Cruz-Landim, 2009 - Figura 7A, B). É no protocérebro que estão localizados os corpos pedunculados, também conhecidos como corpos em forma de cogumelos (*mushroom bodies*), essas são estruturas pares, onde cada um é formado por duas massas de neurópilas em forma de taça ou cálice (Cruz-Landim, 2009). Essas estruturas estão relacionadas à

plasticidade comportamental, já que atuam como centros de integração e processamento de informações olfativas e visuais, além de integrar diferentes tipos de estímulos sensoriais que auxiliam na aprendizagem e adaptação das abelhas (Cruz-Landim, 2009; Kiya; Kunieda; Kubo, 2007; Komischke *et al.*, 2005; Paulk; Gronenberg, 2008). Os corpos pedunculados das abelhas e vespas são grandes e complexos, porém esse tamanho varia de acordo com a complexidade do inseto (Cruz-Landim, 2009). Os elementos principais dessa estrutura são as células de Kenyon, que ditam sua anatomia e fisiologia (Azevedo; Nocelli, 2020; Heisenberg, 1998). Essa é uma típica célula que se estende em finas fibras para formar as neurópilas que formam os lobos associados ao cérebro (Azevedo; Nocelli, 2020; Brandt *et al.*, 2005; Fahrbach, 2006).

Figura 7 - Estruturas do cérebro das abelhas, baseado em *Apis mellifera*. (A) Ilustração das estruturas morfológicas do cérebro - cc: corpo central; GS: gânglio subesofágico; LA: lobo antenal; LO: lobo óptico; OC: olho composto; Pr: protocérebro; pc: pons cerebral; CP: corpo pedunculado; CL: cálice lateral; CM: cálice medial; Pe: pedúnculo; α : pedúnculo externo; β : pedúnculo interno; a: anel basal; b: borda; c: colar. (B) Cérebro dissecado.

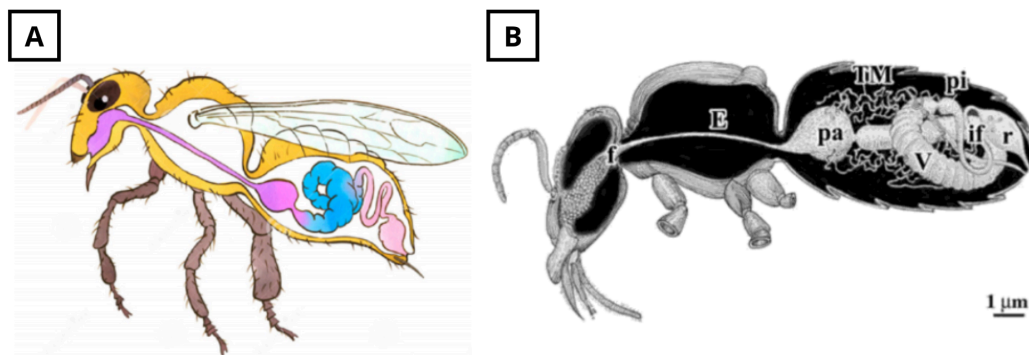


Fonte: Azevedo; Nocelli, 2020.

3.4 SISTEMA DIGESTÓRIO: INTESTINO

O sistema digestório das abelhas é composto, basicamente, por três regiões: estomodeo ou intestino anterior, mesêntero ou intestino médio e proctodeo ou intestino posterior, sendo que essas regiões são formadas por diferentes órgãos (Cruz-Landim, 2009 - Figura 8A). Além disso, o estomodeo e o proctodeo possuem origem endodérmica, já o mesêntero tem origem endodérmica, sendo que esse, especialmente nas abelhas, pode ser chamado de ventrículo (Cruz-Landim, 2009).

Figura 8 - Representação do sistema digestório das abelhas. (A) Ilustração do sistema digestório com delimitações dos órgãos baseado em *Apis mellifera*. (B) Representação do sistema digestório de *Scaptotrigona postica*. f: faringe; E: esôfago; pa: papo; V: ventrículo; pi: piloro; if: intestino fino; r: reto; TM: túbulo de Malpighi.



Fonte: A: Bomfim; Oliveira; Freitas, 2017. B: Cruz-Landim, 2009.

O intestino anterior, também chamado de estomodeo, tem a função de ingestão, armazenamento e possível trituração do alimento (Cruz-Landim, 2009). Ele é constituído pela faringe, esôfago, papo e proventrículo, o qual é chamado de moela em outros insetos (Cruz-Landim, 2009 - Figura 8B). A parede do estomodeo é formada por um epitélio de células baixas, que são cobertas por cutícula apical na face luminal e por uma capa de musculatura externa à porção basal do epitélio (Cruz-Landim, 2009). Além disso, essa região não produz enzimas, de modo que, se há digestão no intestino anterior, é devido as enzimas produzidas nas glândulas do sistema salivar ou regurgitadas pelo intestino médio (Cruz-Landim, 2009).

O intestino médio, também chamado de mesêntero ou ventrículo, é a região onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e da absorção dos produtos dessa digestão, sendo considerado o estômago funcional dos insetos (Cruz-Landim, 2009 - Figura 8B). É formado por células secretoras, produtoras de enzimas; células regenerativas, na base do epitélio, e digestivas, responsáveis por regenerar o tecido epitelial e absorver os nutrientes, respectivamente; além das células glandulares, que produzem substâncias que facilitam a digestão e absorção dos nutrientes (Cruz-Landim, 2009). Devido a essa capacidade de

absorção, é frequentemente usado em estudos ecotoxicológicos (Araujo *et al.*, 2019; Catae *et al.*, 2018; Carneiro *et al.*, 2020; Pettis *et al.*, 2012). O tamanho do ventrículo varia entre as espécies e entre os indivíduos de uma mesma colônia, de modo que as rainhas possuem ventrículos mais longos e as operárias mais curtos (Cruz-Landim, 2009; Ferreira; Cruz-Landim, 2004).

Já o intestino posterior, também chamado de proctodeo, é formado pelo piloro, válvula pilórica, íleo, reto e papilas retais (Cruz-Landim, 2009 - Figura 8B), essa região do intestino é responsável, principalmente, pela formação e armazenamento das fezes (Bomfim; Oliveira; Freitas, 2017). O proctodeo, assim como o estomodeo, tem origem ectodérmica, sendo formado por células epiteliais de revestimento, onde a luz do órgão é revestida por uma cutícula, que reveste a porção apical do epitélio, que é continua com a cutícula do tegumento na região anal (Cruz-Landim, 2009).

3.5 EFEITOS COMPORTAMENTAIS CAUSADOS PELO FLUPIRADIFURONA EM ABELHAS

Por ser um inseticida neurotóxico, o flupiradifurona afeta o sistema nervoso central do inseto (Nauen *et al.*, 2014). Sendo assim, ao não causar a morte instantânea do animal, pode gerar diferentes efeitos subletais (Al Naggari; Baer, 2019; Dorigo, 2022; SIVITER *et al.*, 2024). Diferentes estudos realizados com abelhas *Apis mellifera* (Hesselbach; Scheiner, 2019; Hesselbach; Scheiner, 2019) e *Osmia lignaria* (Siviter *et al.*, 2024), mostraram que doses ambientalmente relevantes de flupiradifurona influencia a eficiência do forrageamento das abelhas (Hesselbach; Scheiner, 2019; Hesselbach; Scheiner, 2019; Siviter *et al.*, 2024). Em contrapartida, Guo *et al.* (2021) não observou alterações no número médio de forrageiras de *Apis mellifera* com pólen. Além disso, durante a visitação às flores, o flupiradifurona pode levar as abelhas a demorarem mais tempo para coletar néctar e pólen (Siviter *et al.*, 2024). Além de acelerar o início do forrageamento, e não interferir na finalização, ou seja, a exposição ao flupiradifurona pode levar as abelhas a forragear menos dias (Hesselbach; Scheiner, 2019), e reduzir o consumo alimentar das abelhas (Tosi *et al.*, 2021).

Apesar desses resultados, Hesselbach e Scheiner (2019) mostraram que os efeitos nas habilidades motoras vistos logo após uma exposição de dose única (após 15 min), não são vistos depois de um período mais longo após a exposição (60 min). De modo que, comportamentos como andar em círculos e permanecer deitadas com as pernas para cima são

vistos logo após a exposição, mas deixam de ser observados após 60 min (Hesselbach; Scheiner, 2019). E o aumento na falta de coordenação dos movimentos (Tosi *et al.*, 2021) e nos espasmos (Coelho, 2021) também podem ser vistos em abelhas expostas ao flupiradifurona, o que as torna mais propensas a paralisia (Coelho, 2021). Além de comprometer a limpeza do ninho, de modo que as abelhas expostas podem reduzir a execução desse comportamento (Hesselbach; Scheiner, 2019)

Além disso, Siviter *et al.* (2024) mostrou que esse inseticida afeta o sucesso de nidificação de abelhas solitárias (*Osmia lignaria*), de modo que abelhas expostas demoram mais tempo para iniciar o processo de construção dos ninhos, apesar de não afetar o número de células feitas nos ninhos. Porém, pouco se conhece sobre os efeitos desse inseticida em aspectos da locomoção, como velocidade e movimentação, já que o foco de alguns estudos são as atividades motoras em geral, como espasmos (Coelho, 2021) e abelhas deitadas com as pernas para cima (Hesselbach; Scheiner, 2019). Além do que, há escassez de estudos da exposição das abelhas em condições naturais, de modo que a grande maioria dos trabalhos são realizados *in vitro* (Coelho, 2021; Hesselbach; Scheiner, 2019; Hesselbach; Scheiner, 2019; Tosi *et al.*, 2019, 2021).

4 ARTIGO

Impactos do flupiradifurona no intestino e cérebro da abelha social neotropical *Scaptotrigona postica* e seus impactos comportamentais

Impacts of flupyradifurone on the gut and brain of the neotropical social bee *Scaptotrigona postica* and its behavioral effects

Resumo

O uso indiscriminado de agrotóxicos é um dos grandes fatores estressores responsáveis pelo declínio da população mundial de polinizadores. Baseado nisso, diferentes substâncias são desenvolvidas, a fim de reduzir danos a organismos não-alvo. O flupiradifurona, por exemplo, é um agrotóxico relativamente novo, o qual teve seu registro em 2014, e tem a proposta de ser uma alternativa mais segura para o ambiente, em comparação com neonicotinoides. No entanto, os efeitos dessa substância em abelhas nativas de países neotropicais permanecem

pouco compreendidos, tendo em vista que a maioria dos estudos são feitos com a espécie modelo *Apis mellifera*. Baseado nisso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do inseticida flupiradifurona na sobrevivência e comportamento de locomoção de *Scaptotrigona postica*, além dos impactos morfológicos no cérebro e intestino médio das abelhas através de uma exposição oral crônica a uma concentração ambientalmente relevante do flupiradifurona. Para realização dos bioensaios de sobrevivência, abelhas de colônias não-imãs foram alimentadas com xarope de sacarose 50% m/m contendo o inseticida (grupo exposto) e o xarope sem o inseticida (grupo controle) até a morte do último indivíduo. Para as análises comportamentais e histológicas, as forrageiras de *S. postica* foram expostas ao inseticida durante sete dias, em seguida indivíduos foram dissecadas para obtenção dos órgãos e outros indivíduos foram submetidos a filmagens em arenas. A partir dos resultados foi possível observar que a exposição ao flupiradifurona não interferiu na sobrevivência das abelhas, de modo que os indivíduos dos grupos controle e exposto sobreviveram por tempo semelhante. Porém, o inseticida é responsável pela redução no comportamento de locomoção das abelhas. Essa alteração comportamental pode ser explicada pelo inseticida ter alterado a disposição das células de Kenyon (compactadas e internas), tendo em vista que, nas abelhas do grupo exposto, aumentou entre 1,9 - 2 vezes a distância entre as células de Kenyon. Em contrapartida, o flupiradifurona não influenciou na morfologia do intestino médio das abelhas. Portanto, em condições laboratoriais, o inseticida flupiradifurona tem interferência nas células de Kenyon, resultando em alterações comportamentais, mas esses efeitos adversos não têm interferência na sobrevivência das abelhas, e nem na morfologia do intestino médio.

Palavras-chave: abelhas sem-ferrão; agrotóxico; inseticida; neurotoxicidade; digestão; sobrevivência.

4.1 INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos conhecidos devido a sua eficiência na polinização (Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011; Silva; Paz, 2012). Há aproximadamente 20 mil espécies de abelhas distribuídas pelo mundo (Freitas *et al.*, 2009; Santos; Carvalho; Silva, 2004), desempenhando papel fundamental na polinização de plantas cultivadas e ecossistemas naturais (Nicholls; Altieri, 2013), podendo atuar como polinizadores de quase 90% das plantas com flores pelo mundo (D'ávila; Marchini, 2005). Apesar de diferentes espécies de insetos atuarem como

polinizadores, as abelhas são consideradas os principais responsáveis pela polinização de culturas agrícolas pelo mundo (Mcgregor, 1976; Watanabe, 1994; Klein *et al.*, 2007).

Entre as famílias de abelhas existentes, a Apidae destaca-se por sua ampla diversidade de espécies e hábitos ecológicos (Michener, 2007). Dentro dessa família encontra-se a tribo Meliponini, a qual é composta por abelhas sociais sem ferrão (meliponídeos), que possuem esse nome devido ao ferrão ausente ou atrofiado (Michener, 2007), sendo nativas dos trópicos e subtropicais do planeta (Ayala; Gonzalez; Engel, 2013). A *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), popularmente conhecida por mandaguari, por exemplo, é uma espécie de meliponídeo que vive em ocos de árvores, podendo ter até 20.000 indivíduos em suas colônias (Nogueira-Neto, 1997), e são encontradas desde o México ao Brasil (Nogueira-Neto, 1997). É responsável pela polinização de culturas agrícolas como caju, morango, pitanga, açaí, entre outras (Souza *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2020).

Porém, apesar da grande importância das abelhas, esses polinizadores têm sofrido diversas ameaças devido a diferentes fatores, como a perda de habitat (Jaffé *et al.*, 2019), mudanças climáticas (Becker; Pequeno; Carvalho-Zilve, 2018; Jaffé *et al.*, 2019) e competição por recursos (Hung *et al.*, 2019), resultando na diminuição mundial das populações (Becker; Pequeno; Carvalho-Zilve, 2018; Hung *et al.*, 2019; Jaffé *et al.*, 2019). Além disso, a ação humana em conjunto com o uso inadequado dos agrotóxicos está entre os fatores com maior impacto na ameaça à biodiversidade desses animais (Dudley; Alexander, 2017). Devido à ação sistêmica de muitos agrotóxicos, e consequentemente à alta capacidade de permanecer no ambiente, essas substâncias têm apresentado grande ameaça para as abelhas (Freitas *et al.*, 2017).

Levando em consideração as informações supracitadas e a importância em garantir rendimentos dos plantios agrícolas (Godfray *et al.*, 2010), é necessária atenção no desenvolvimento e descoberta de novas substâncias sintéticas para defensivos agrícolas (Pisa *et al.*, 2021), pois já foi demonstrado que alguns agrotóxicos possuem efeitos nocivos para os polinizadores, como efeitos letais e subletais (Blacquièrre *et al.*, 2012; Schneider *et al.*, 2012; Tsvetkov *et al.*, 2017). O flupiradifurona, por exemplo, é um inseticida sistêmico, desenvolvido pela Bayer CropScience em 2014, que pertence ao grupo químico butenolidas (Nauen *et al.*, 2014). Semelhante aos neonicotinoides e sulfoximinas, esse inseticida atua sobre os nAChRs (Nauen *et al.*, 2014), e é usado para controle de pragas agrícolas, como ácaros, pulgões e moscas-branca (Nauen *et al.*, 2014; Bayer, 2022).

Desde o seu registro, o flupiradifurona foi registrado em mais de 50 países, incluindo Austrália, Brasil, China, Estados Unidos, Japão e Nova Zelândia (EFSA *et al.*, 2022). Tendo seu uso permitido em culturas como soja, café, citrus, algodão, cacau, lúpulo, maracujá, pimentão, berinjela, pimenta, além de plantas ornamentais (Nauen *et al.*, 2014; Bayer, 2022). Apesar de ser considerado uma alternativa mais segura e menos tóxica ao ambiente, quando comparado a outros inseticidas neurotóxicos, ainda é necessário compreender o real impacto do flupiradifurona aos polinizadores (Siviter *et al.*, 2024). Já que, quando as abelhas são expostas a diferentes concentrações desse inseticida, podem sofrer diferentes efeitos como redução do sucesso de nidificação (Siviter *et al.*, 2024), comprometimento na eficiência de forrageamento (Hesselbach; Scheiner, 2019; Siviter *et al.*, 2024), aumento na mortalidade (Al Naggar; Baer, 2019; Hesselbach; Scheiner, 2019; Siviter *et al.*, 2024; Tong; Nieh; Tosi, 2019), alteração na expressão de genes imunológicos e de desintoxicação (Al Naggar; Baer, 2019), entre outros efeitos.

Porém, os estudos toxicológicos envolvendo as abelhas sem ferrão são escassos, e geralmente estão relacionados a análises histopatológicas (Lima *et al.*, 2016), sendo necessário mais estudos a respeito dos impactos dos inseticidas na relação e dinâmica das abelhas, além dos efeitos toxicológicos em nível subindividual (Lima *et al.*, 2016). Além do que, muitos dos estudos com o inseticida flupiradifurona foram realizados com *Apis mellifera* (Tan *et al.*, 2017; Tosi; Nieh, 2019; López; Valadez-Moctezuma; Vargas-Hernández, 2023), porém há propensão da abelha nativa *Scaptotrigona postica* ter contato com essa substância durante a polinização de culturas como citrus e morango, onde esse inseticida pode ser utilizado (Antonini; Costa; Martins, 2006; Bayer, 2022; Nauen *et al.*, 2014; Luz *et al.*, 2018; Klein *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2015).

Além disso, ainda há efeitos desconhecidos sobre seus efeitos sobre insetos polinizadores. Sendo assim, o presente trabalho visa preencher lacunas no conhecimento a respeito dos efeitos do flupiradifurona em abelhas nativas sem ferrão, avaliando a influência de uma exposição oral crônica a uma concentração ambientalmente relevante do inseticida na longevidade e no comportamento de locomoção de *Scaptotrigona postica*, além dos impactos desse inseticida no cérebro e intestino de abelhas.

4.2 METODOLOGIA

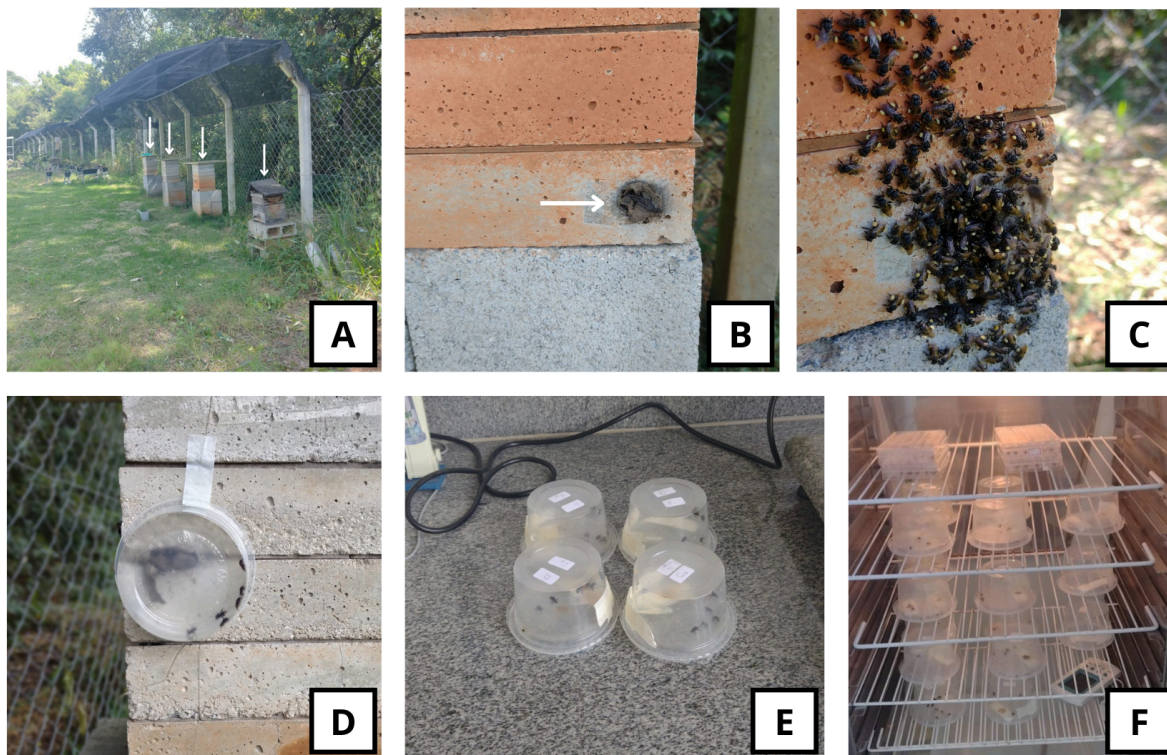
4.2.1 Coleta e manutenção das abelhas

Abelhas forrageiras de *Scaptotrigona postica* foram coletadas em dezembro de 2023, janeiro, março e abril de 2024, na entrada de colônias manejadas e saudáveis, alocadas na Universidade Federal de São Carlos – *campus* Sorocaba (23°34'58"S 47°31'27"W) (Figura 9A), em manhãs de dias ensolarados, com temperatura diária entre 25 e 30°C e umidade de 57 a 75%. A fim de coletar apenas abelhas forrageiras, as entradas das colônias foram fechadas com a própria cera (Figura 9B), em seguida, esperou-se a aglomeração das abelhas na entrada da colônia (Figura 9C) para que um pote plástico transparente de 250 mL fosse posicionado para coleta (Figura 9D), abelhas que não possuíam pólen nas corbículas (indicativo de forrageiras) foram liberadas. Após a coleta, as abelhas eram separadas em potes com 15 indivíduos em cada, contendo um alimentador com solução de sacarose 50% m/m (Figura 9E). A fim de minimizar o efeito do estresse causado pela coleta (Brito *et al.*, 2020), as abelhas foram mantidas nos potes plásticos em estufa incubadora do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) ($28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 5\%$ de umidade) durante o período da noite, ou seja, overnight (Figura 9F).

Todos os experimentos foram realizados seguindo as recomendações do protocolo da OECD n° 245 (2017) para abelhas sociais.

Para garantir a variabilidade inter-colonial das abelhas, foram utilizadas quatro colônias diferentes (A, B, C e D) para coleta, seguindo a metodologia de Alkassab e Kirchner (2018) e Jacob *et al.* (2019a).

Figura 9 - Processo de coleta e aclimatação das abelhas *Scaptotrigona postica*. (A) Colônias de *Scaptotrigona postica* indicadas com setas. (B) Entrada da colônia fechada com cera, indicada pela seta. (C) Acúmulo de abelhas na entrada da colônia. (D) Coleta de abelhas utilizando pote plástico. (E) Abelhas separadas em diferentes potes plásticos, contendo 15 indivíduos em cada. (F) Aclimatação das abelhas em estufa B.O.D.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 Definição da concentração do inseticida flupiradifurona

Para realização dos bioensaios, foi utilizada uma concentração ambientalmente relevante do inseticida flupiradifurona, com base nas concentrações residuais encontradas em florescências de citrus, sendo selecionada a concentração de 4 mg/kg (EPA, 2014). Essa escolha foi feita considerando que abelhas *Scaptotrigona postica* visitam essa cultura (Souza *et al.*, 2015), e o agrotóxico flupiradifurona tem seu uso autorizado nesses cultivos (Bayer, 2022).

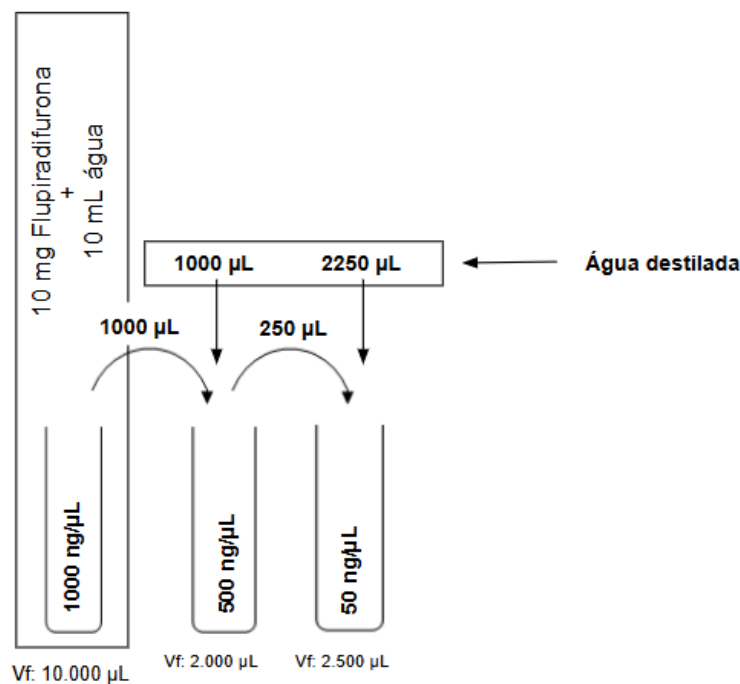
Além disso, foram empregados os modelos BeeRex e T-Rex, conforme o manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas do IBAMA (Cham *et al.*, 2020), utilizando os dados da formulação comercial na concentração de 200 g/L do princípio ativo (Sivanto Prime 200 SL), a fim obter informações sobre as concentrações ambientais em que as abelhas poderiam estar expostas em um pior cenário. Para aplicação em citrus, utiliza-se 0,8 L/ha do produto comercial, que equivale a 160 g do princípio ativo, sendo indicado 2

aplicações por ciclo da cultura em um intervalo de 14 dias, sendo que a aplicação deve ser foliar e de forma terrestre (Bayer, 2022). Os valores obtidos variaram entre 9 (T-Rex) e 15 (BeeRex) mg/kg, ou seja, a concentração residual (4 mg/kg), utilizada neste estudo, representa um valor de 2 a 3 vezes menor quando comparado aos piores cenários que as abelhas poderiam ser expostas.

4.2.3 Preparo das soluções e alimentos

Para obtenção do alimento contendo o inseticida na concentração de 4 mg/kg, foi preparado, inicialmente, uma solução estoque com 10 mg do flupiradifurona (Sigma-Aldrich, CAS Number: 951659-40-8, pureza > 99%) diluído em 10 mL de água destilada, obtendo uma solução com concentração de 1000 ng/μL. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas da solução estoque a fim de obter uma solução final com concentração de 50 ng/μL (Figura 10). Dessa solução, foi aliqotado 2000 μL e adicionado 23000 μL de solução de sacarose 50% m/m para obtenção de 25 mL de alimento contendo flupiradifurona, tendo concentração final de 4 mg/kg. Todas as soluções preparadas foram mantidas em frasco âmbar protegidos com papel alumínio e mantidos a 4°C, para evitar degradação do agrotóxico (Tosi *et al.*, 2021).

Figura 10 - Representação da produção da solução estoque e diluições seriadas.



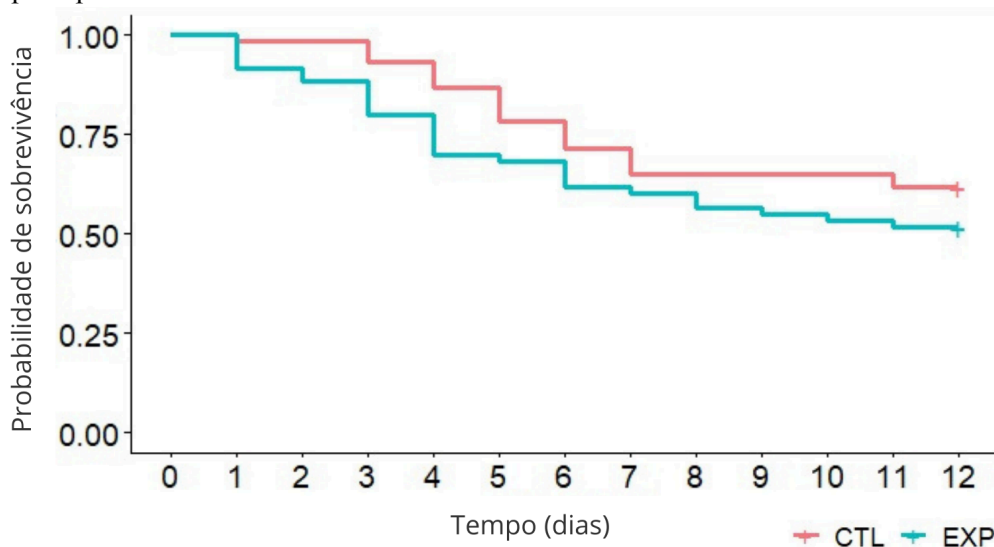
Fonte: elaborado pela autora.

Após o preparo, cada solução estoque foi utilizada durante 1 mês. Além disso, um novo alimento contendo flupiradifurona era preparado semanalmente (Wu-Smart; Spivak, 2016; Tosi *et al.*, 2021), e as soluções seriadas para preparo do alimento também eram refeitas a cada 7 dias (Wu-Smart; Spivak, 2016; Tosi *et al.*, 2021), sendo que o alimento oferecido às abelhas era trocado a cada 2 dias (El-Din *et al.*, 2022), seguindo metodologias de experimentos semelhantes já padronizados.

4.2.4 Determinação do tempo de exposição para análises histológica e comportamental

Para determinação do tempo de exposição para os bioensaios histológicos e comportamentais, foi realizado um ensaio piloto no mês de dezembro de 2023. Para realização do experimento, 20 abelhas forrageiras de cada colônia foram coletadas e aclimatadas, como descrito no item 4.2.1. Das abelhas coletadas, 10 indivíduos foram expostos ao flupiradifurona (4 mg/kg), através do alimento contaminado, e 10 indivíduos foram usados como controle, sendo alimentados apenas com solução de sacarose 50% m/m. O experimento teve duração de 12 dias, tendo em vista que a partir do 7º dia de exposição, a mortalidade das abelhas do grupo controle estabilizou até o final do experimento (12º dia). Os resultados mostraram que não houve diferença significativa no tempo de sobrevivência das abelhas entre os grupos ($p = 0,18$), de modo que, os indivíduos de ambos os tratamentos sobreviveram por tempo semelhante (Figura 11). Sendo assim, baseado no ensaio piloto, o tempo de exposição de 7 dias foi estabelecido para os bioensaios seguintes como foco nas análises histológicas e comportamentais. Além disso, durante o monitoramento diário, foi possível observar de forma recorrente a presença dos parasitas forídeos nas abelhas *Scaptotrigona postica*, o que resultava na morte de alguns indivíduos.

Figura 11 - Taxa de mortalidade das abelhas durante o período do ensaio piloto. CTL: grupo controle; EXP: grupo exposto.



Fonte: elaborado pela autora.

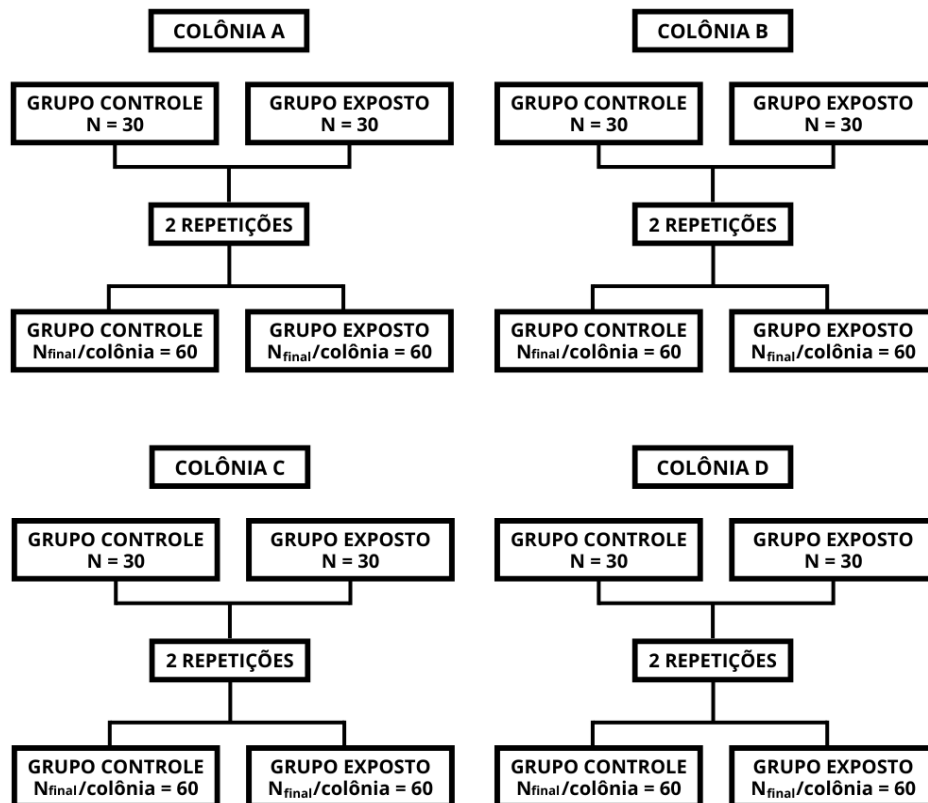
4.2.5 Bioensaio de sobrevivência

Para realização do bioensaio de sobrevivência, foram feitos dois blocos de repetição, nos meses de março e abril de 2024, baseado no protocolo da OECD n° 245. Para cada bloco foram coletadas 60 abelhas por colônia, sendo que 30 abelhas foram expostas ao flupiradifurona (4 mg/kg) através do alimento (preparado conforme o item 3.3) e 30 abelhas, compondo o grupo controle, foram alimentadas com o alimento sem o inseticida (somente solução de sacarose 50% m/m).

Após a coleta e aclimação, descrito no item 3.1, as abelhas foram alimentadas durante dias consecutivos com uma solução de sacarose 50% m/m (grupo controle) e com uma solução de sacarose com flupiradifurona (grupo exposto ao inseticida), até a morte do último indivíduo. Além do monitoramento e contagem diária das abelhas, o alimento foi pesado diariamente, a fim de verificar o consumo, descontando a taxa diária de evaporação [(peso inicial do alimento – peso do alimento após 24h) - taxa diária de evaporação]. Ademais, levando em consideração que a presença de forídeos é comum em abelhas (Casuso; Mortensen; Ellis, 2014; Ribeiro; Panetti; Costa, 2016), como visto no ensaio piloto (descrito no item 3.5), a emergência de larvas desses parasitas também foi monitorada diariamente ao longo de todo o bioensaio de sobrevivência, a fim de analisar a sua presença ou ausência nas abelhas. A presença de forídeos foi facilmente observada devido à ocorrência da eclosão dos ovos dos parasitas no corpo das abelhas, o que leva a “explosão” da cabeça e parte do tórax.

Todos os dados referentes ao período de exposição foram registrados em planilhas para posterior análise estatística. Ao final dos dois blocos de repetição do teste de sobrevivência, foi obtido um N_{final} total de 480 indivíduos, sendo 240 indivíduos do grupo controle e 240 indivíduos do grupo exposto (Figura 12).

Figura 12 - Descrição esquematizada da contagem do N_{final} do experimento de avaliação de sobrevivência de *Scaptotrigona postica*.



Fonte: Elaborado pela autora

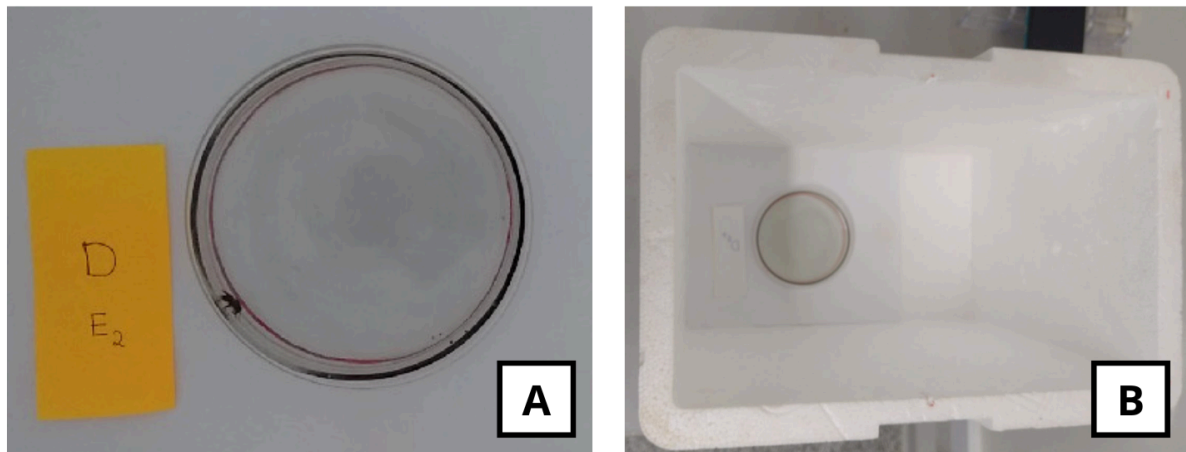
4.2.6 Bioensaio comportamental de locomoção

Para realização do bioensaio comportamental, foram utilizadas as abelhas que estavam sendo submetidas ao bioensaio de sobrevivência, sendo assim, as filmagens para análise comportamental também foram realizadas nos meses de março e abril de 2024. A filmagem dos indivíduos de cada bloco de repetição foi realizada em um único dia entre 9:00 e 16:00, levando em consideração o período de atividade das abelhas, baseado em Arce *et al.* (2018).

Após 7 dias de exposição, tempo determinado no item 4.2.4, as abelhas foram filmadas em uma arena de filmagem (Figura 13A), e para evitar interferência da luminosidade lateral, as arenas foram alocadas dentro de caixas maiores (Figura 13B). Antes das filmagens, as

abelhas foram individualizadas e mantidas em jejum por 15 minutos (Jacob *et al.*, 2019b). Em seguida, uma abelha por vez foi filmada durante 10 minutos cada (Tadei *et al.*, 2019; Tomé *et al.*, 2012, 2015). Após o tempo de filmagem, as abelhas foram acondicionadas em potes separados, antes de serem devolvidas aos seus respectivos potes, a fim de evitar que o mesmo indivíduo fosse gravado duas vezes. Foram filmados 4 indivíduos por colônia, de potes diferentes, e como resultado da repetição dos blocos, foram produzidos 64 vídeos, 32 vídeos do grupo controle e 32 vídeos do grupo exposto.

Figura 13 - Arena de filmagem usada para avaliação dos parâmetros comportamentais de *Scaptotrigona postica*. (A) Arena utilizada durante as filmagens. (B) Modo em que a arena utilizada foi alocada dentro de uma caixa.



Fonte: elaborado pela autora.

Os vídeos obtidos foram analisados usando o software de rastreamento de vídeo EthoVision, versão 15 (Noldus; Spink; Tegelenbosch, 2001). Os parâmetros comportamentais referentes à locomoção analisados foram velocidade média, distância percorrida, tempo de movimentação e frequência de rotações (Quadro 1).

Quadro 1 - Parâmetros comportamentais analisados e suas respectivas descrições, segundo o software Ethovision (Noldus) versão 1.5.

| Parâmetro | Descrição |
|---------------------------|--|
| Velocidade média (cm/s) | Velocidade média de locomoção das abelhas dentro da arena durante os 10 minutos de filmagem. |
| Distância percorrida (cm) | Distância total percorrida pelo indivíduo durante os 10 minutos de filmagem. |

| | |
|---------------------------|--|
| Tempo de movimentação (s) | Tempo total de movimentação das abelhas dentro da arena durante os 10 minutos de filmagem, ou seja, tempo em que os indivíduos estavam móveis durante a gravação. Sendo que, a partir da velocidade 0,55 cm/s, o indivíduo foi considerado móvel, e abaixo disso, imóvel. Esse valor foi determinado a partir da observação de vídeos em que as abelhas estavam visualmente paradas. A partir da determinação e escolha dos vídeos, observou-se o valor da velocidade desses indivíduos que foi apresentado no software Ethovision. E a partir disso, o valor de 0,55 cm/s foi escolhido como velocidade mínima para determinar o status “móvel”. |
| Frequência de rotações | Número de vezes que os indivíduos completaram uma volta total (360°) em torno do próprio corpo durante os 10 minutos de filmagem. |

Fonte: elaborado pela autora.

4.2.7 Análises histológicas

Para realização das análises histológicas, 20 abelhas forrageiras de cada colônia foram coletadas e aclimatadas, como descrito no item 4.2.1, no mês de janeiro de 2024, a fim de coletar o intestino e o cérebro. Em seguida, 10 indivíduos foram expostos ao flupiradifurona (4 mg/kg), através do alimento contaminado, e 10 indivíduos foram usados como controle, sendo alimentados apenas com solução de sacarose 50% m/m. Após 7 dias de exposição oral, 4 indivíduos de cada colônia foram anestesiados por refrigeração e submetidos à dissecação. Os cérebros e intestinos coletados foram imersos em solução fixadora (paraformaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1 M; pH 7,4) durante 24 horas a 4°C. Em seguida, os órgãos foram lavados utilizando o mesmo tampão fixador e submetidos a desidratação lenta gradativa, de acordo com o protocolo de Silva-Zacarin *et al.* (2012). Esse protocolo baseia-se na desidratação lenta gradativa com trocas de soluções de etanol com concentrações crescentes à baixa temperatura (4°C) e submissão à resina líquida Leica® (resina de embebição) (Figura 14).

Figura 14 - Etapas do protocolo de desidratação lenta gradativa.

| | | |
|---|--|---|
| <p>1</p> <p>Álcool 15% 1 hora</p> <p>(solução gelada)</p> | <p>2</p> <p>Álcool 30% 1 hora</p> <p>(solução gelada)</p> | <p>3</p> <p>Álcool 50% 1 hora</p> <p>(solução gelada)</p> |
| <p>4</p> <p>Álcool 70% Overnight</p> <p>(manter a solução gelada)</p> | <p>5</p> <p>Álcool 85% 1 hora</p> <p>(solução gelada)</p> | <p>6</p> <p>Álcool 90% 1 hora</p> <p>(solução gelada)</p> |
| <p>7</p> <p>Álcool 95% 1 hora</p> <p>(solução gelada)</p> | <p>8</p> <p>Álcool 100% 1 hora</p> <p>(solução gelada)</p> | <p>9</p> <p>Resina de embebição 5 dias</p> <p>(manter a solução gelada)</p> |

Fonte: Elaborado pela autora.

Após a etapa da resina de embebição, os órgãos coletados foram emblocados em histomoldes em historesina Leica® de inclusão. Após a polimerização, os blocos de resina passaram por cortes histológicos (secções) feitos em micrótomo, com espessura de 3 µm, e foram colocados em lâminas de vidro. A quantidade de lâminas por indivíduo variou de acordo com o tamanho e posição do órgão, mas de modo geral, foram produzidas, em média, 20 lâminas com 10 secções, de cada indivíduo.

As análises histológicas do intestino médio foram realizadas através da caracterização semi-quantitativa das alterações do órgão a partir da observação de 7 intestinos do grupo controle e 8 do grupo exposto, tendo 12 secções por indivíduo. Para isso, 6 lâminas, por indivíduo, foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E.) (1%, Anexo 1), sendo analisadas 2 secções por lâmina para análise morfológica do epitélio, totalizando 12 secções analisadas.

Para análise das alterações no intestino médio foram determinados parâmetros adaptados de Bennett *et al.* (1999) descritos por Grella *et al.* (2019), Oliveira *et al.* (2019) e Taddei; Menezes-Oliveira; Silva-Zacarin (2020) (Tabela 1). Foi atribuído um valor para cada parâmetro de acordo com a importância da alteração. O fator de importância foi classificado

em 3 níveis: 1 – mínima importância patológica (danos reversíveis), 2 – moderada importância patológica (danos geralmente reversíveis); 3 – severa importância patológica (danos irreversíveis). E a presença das alterações foram classificadas em 4 níveis de intensidade: 0 – ausência de alteração, 1 – alteração leve, 2 – alteração moderada, 3 – alteração intensa. (Oliveira *et al.*, 2019; Tadei; Menezes-Oliveira; Silva-Zacarin, 2020).

Tabela 1 - Parâmetros histológicos utilizados para análise semi-qualitativa dos danos no intestino médio de abelhas *Scaptotrigona postica* e o fator de importância correspondente.

| Parâmetros | Fator de importância |
|--|-----------------------------|
| Vacúolos no citoplasma | 1 |
| Secreção apócrina | 1 |
| Liberção de células para o lúmen | 1 |
| Diferenciação dos ninhos de células regenerativas | 1 |
| Núcleos com cromatina compactada | 1 |
| Núcleo picnótico nas células digestivas | 2 |
| Vacuolização degenerativa / perda citoplasmática | 2 |
| Vilosidades (estrutura, distribuição e frequência) | 3 |
| Redução de ninhos de células regenerativas | 3 |
| Núcleo picnótico nas células regenerativas | 3 |

A partir desses dados, foi calculado o índice de lesão de cada alteração (I_{le}) (Equação 1). E para cada secção analisada foi calculado o índice de lesão do órgão (I_o) (Equação 2), para cálculo do índice de lesão por indivíduo.

Equação 1 - Equação para cálculo do índice de lesão. a = nível de intensidade, w = fator de importância.

$$I_{le} = a \times w$$

Fonte: elaborado por Bennett *et al.* (1999) adaptado por Oliveira *et al.*, 2019 e Tadei; Menezes-Oliveira; Silva-Zacarin, 2020.

Equação 2 - Equação para cálculo do índice de lesão por secção para conhecimento do índice de lesão por indivíduo. a = nível de intensidade, w = fator de importância; Σalt = somatória de alterações.

$$I_{org} = \sum_{alt} a \times w$$

Fonte: elaborado por Bennett *et al.* (1999) adaptado por Oliveira *et al.*, 2019 e Tadei; Menezes-Oliveira; Silva-Zacarin, 2020.

Já para as análises histológicas do cérebro, foi realizada a caracterização quantitativa das alterações do órgão a partir da observação de 10 cérebros por grupo experimental. Para isso, metade das lâminas produzidas por indivíduo foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H.E.) (Anexo 1), a fim de analisar diferentes níveis do órgão, para análise das células de Kenyon, localizadas nos corpos pedunculados. A partir das lâminas coradas, foram adquiridas imagens, usando fotomicroscópio em aumento de 40x, que permitiram a visualização das estruturas celulares. De modo que, cada imagem corresponde a uma seção específica do cérebro em diferentes planos. Para cada corpo pedunculado de cada cérebro, foram realizadas medições distintas. As avaliações focaram na largura dos espaços entre as células de Kenyon, nas principais categorias (células internas e células compactadas), com o cálculo da largura média entre as células e a média geral para cada grupo experimental. Dois corpos pedunculados por secção foram analisados, priorizando aqueles localizados na parte externa, devido à possível distorção do órgão. Para cada corpo pedunculado de cada indivíduo, foram analisadas 5 secções, com 20 medições em cada uma. Assim, para cada indivíduo, foram realizadas 100 medições por corpo pedunculado, sendo 50 medições para cada tipo celular.

4.2.8 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram realizadas através do software R (versão 4.0.4; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, AT, 2021), e os dados foram analisados por modelos não-paramétricos, sendo previamente verificados pelo teste de normalidade de Shapiro-wilk. As análises comportamentais foram realizadas utilizando modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição gaussian e quasipoisson. As análises morfométricas do intestino também foram realizadas utilizando GLM com distribuição gaussian. Após a obtenção do GLM foi realizado um pós-teste com um valor P ajustado por Tukey para a comparação par a par entre os grupos experimentais. Já o cérebro foi analisado através da análise não paramétrica do teste Wilconxon. Para as análises de sobrevivência, inicialmente foi realizada uma regressão de Cox a fim de verificar a interferência da presença dos forídeos

nas abelhas. Em seguida, a curva de sobrevivência de Kaplan-Meier foi utilizada para estimar a sobrevivência dos diferentes grupos, seguida pelo teste de Log-rank para comparar as curvas de sobrevivência, e as comparações das médias entre os grupos foram ajustadas pelo método de Tukey. Foram considerados significativos os valores com $p < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Sobrevivência

A presença do inseticida flupiradifurona não influencia negativamente na sobrevivência das abelhas (Regressão de Cox - coeficiente = 0,017; $p = 0,857$), Hazard Ratio (HR) = 1,017 e (Intervalo de confiança (IC) 95%: 0,844 a 1,226). Sendo assim, as abelhas expostas ao inseticida não apresentam diferenças significativas na taxa de mortalidade quando comparadas ao grupo controle (Figura 15), de modo que ambos os grupos sobreviveram por tempo semelhante e possuem tempo letal médio (TL50) próximo (Tabela 2).

Figura 15 - Sobrevivência das abelhas ao longo do experimento, levando em consideração apenas os grupos experimentais. A linha vermelha representa os indivíduos do grupo controle, e a azul, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. CTL: controle; EXP: exposto.

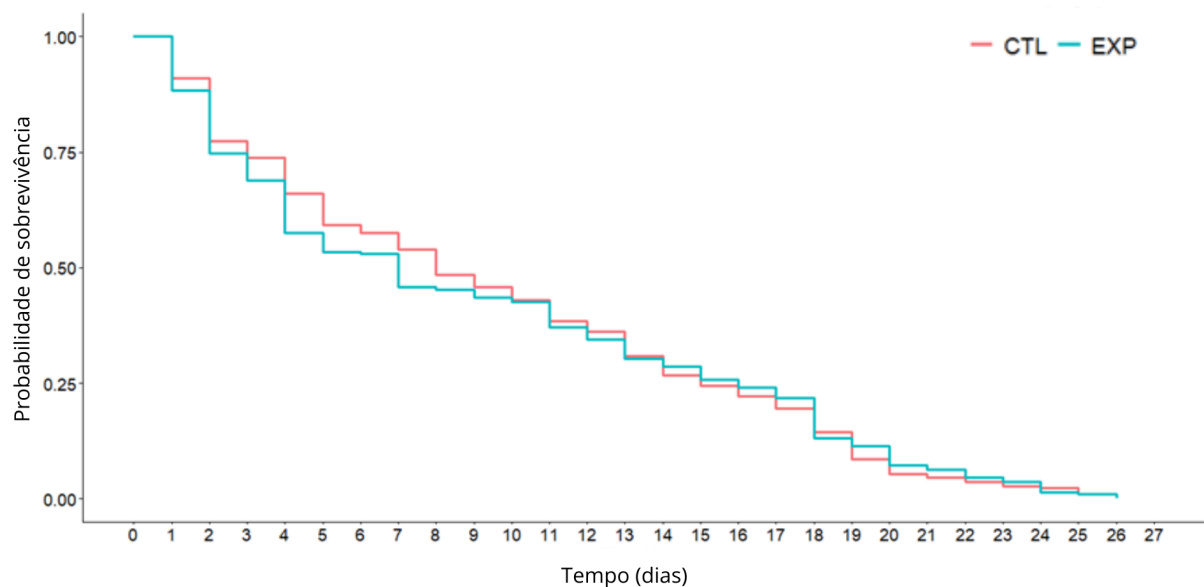
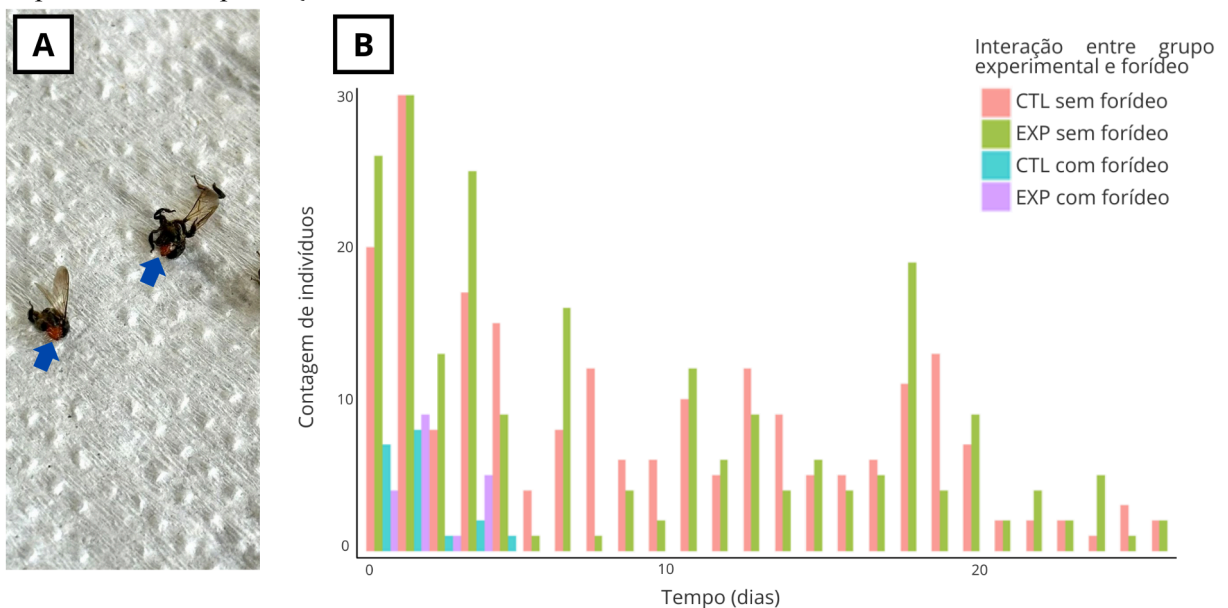


Tabela 2 - Tempo de longevidade e TL50 de *S. postica* durante o experimento.

| Grupo experimental | Longevidade (dias) | TL50 (dias) |
|--------------------|--------------------|-------------|
| Controle | 25-26 | 8 |
| Exposto | 26 | 7 |

Porém, levando em consideração que a presença dos parasitas forídeos (Figura 16A) é extremamente comum nos indivíduos de *Scaptotrigona postica*, foi realizada uma investigação para compreender se a presença desses parasitas é um fator de interferência na sobrevivência das abelhas, nas condições *in vitro*, podendo potencializar a influência do inseticida. E a partir dessa análise, levando em consideração a presença de forídeos, os grupos experimentais e a interação entre esses fatores, foi possível observar que a presença de forídeos, como fator isolado, tem efeito significativo na sobrevivência das abelhas (Regressão de Cox - coeficiente = 1,727; $p < 0,001$), HR = 5,622 (IC 95%: 3,446 a 9,173). Apesar dos parasitas serem observados em apenas 38 indivíduos (19 do grupo controle e 19 do grupo exposto), dos 480 analisados, a presença de forídeos aumenta em cinco vezes a probabilidade de mortalidade das abelhas, porém a interação entre os grupos experimentais e a presença de forídeos não é significativo (Regressão de Cox - coeficiente = -0,208; $p = 0,539$), HR = 0,812 (IC 95%: 0,419 a 1,576). Além disso, o impacto negativo dos forídeos na sobrevivência das abelhas foi semelhante para ambos os grupos ($p = 0,576$), não tendo relação com a presença do inseticida. Portanto, os resultados indicam que a presença de forídeos é o único fator relacionado ao aumento da mortalidade das abelhas, independente do grupo experimental (Figura 16B).

Figura 16 - Forídeos nas abelhas *S. postica*. (A) Forídeos presentes no tórax das abelhas indicados pelas setas azuis. (B) Sobrevivência das abelhas levando em consideração a interação entre os grupos experimentais e a presença de forídeos.



Além disso, a possibilidade do consumo de alimento ter sido um fator de interferência nos resultados foi descartada, levando em consideração que o consumo diário ($p = 0,81$; Tabela 3) e consumo total ($p = 0,29$; Tabela 4) de alimento, através do peso do alimentador, em ambos os grupos experimentais foi semelhante (Figura 17).

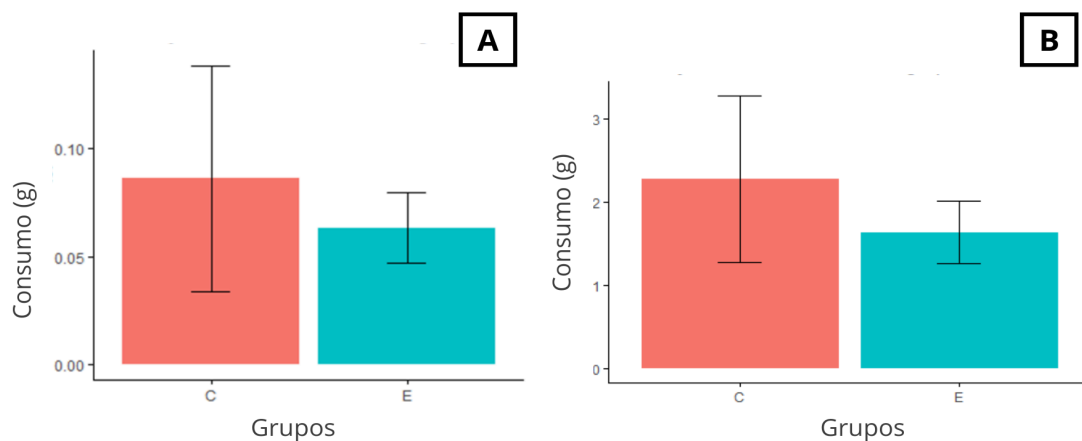
Tabela 3 - Consumo diário, em gramas, de alimento das abelhas *S. postica* durante o experimento.

| Grupo | Média (g) | Desvio padrão |
|----------|-----------|---------------|
| Controle | 0,0861 | 0,052 |
| Exposto | 0,0632 | 0,016 |

Tabela 4 - Consumo total, em gramas, de alimento das abelhas *S. postica* durante o experimento.

| Grupo | Média (g) | Desvio padrão |
|----------|-----------|---------------|
| Controle | 2,28 | 1 |
| Exposto | 1,64 | 0,38 |

Figura 17 - Consumo de alimento, em gramas, das operárias forrageiras de *S. postica* ao longo do experimento (média \pm desvio padrão). (A) Consumo diário. (B) Consumo total. A coluna vermelha representa os indivíduos do grupo controle, e os pontos azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.

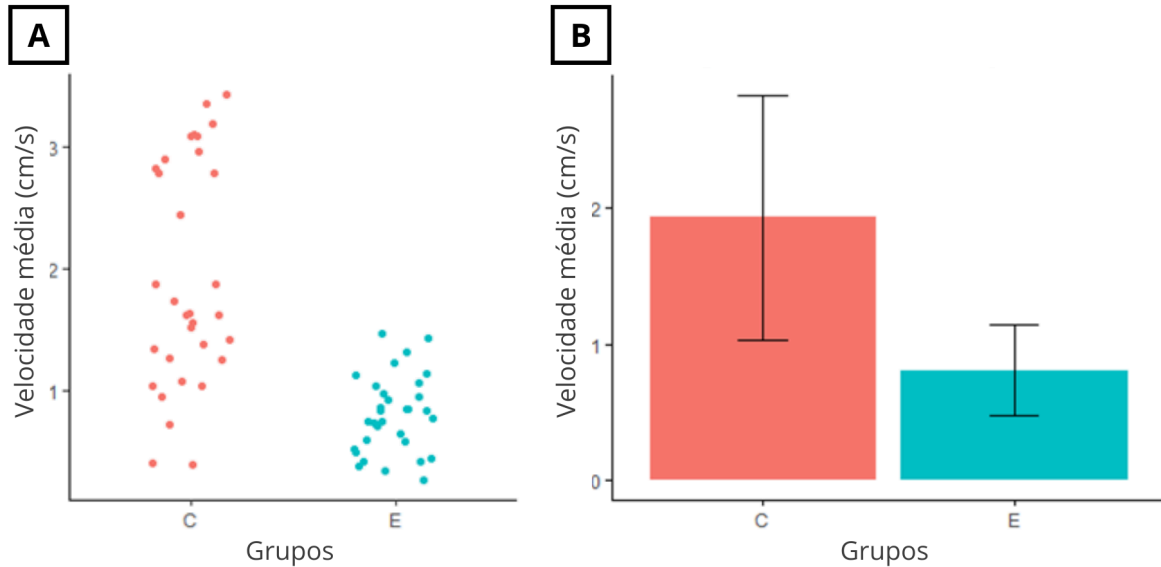


4.3.2 Análise comportamental

4.3.2.1 Velocidade média

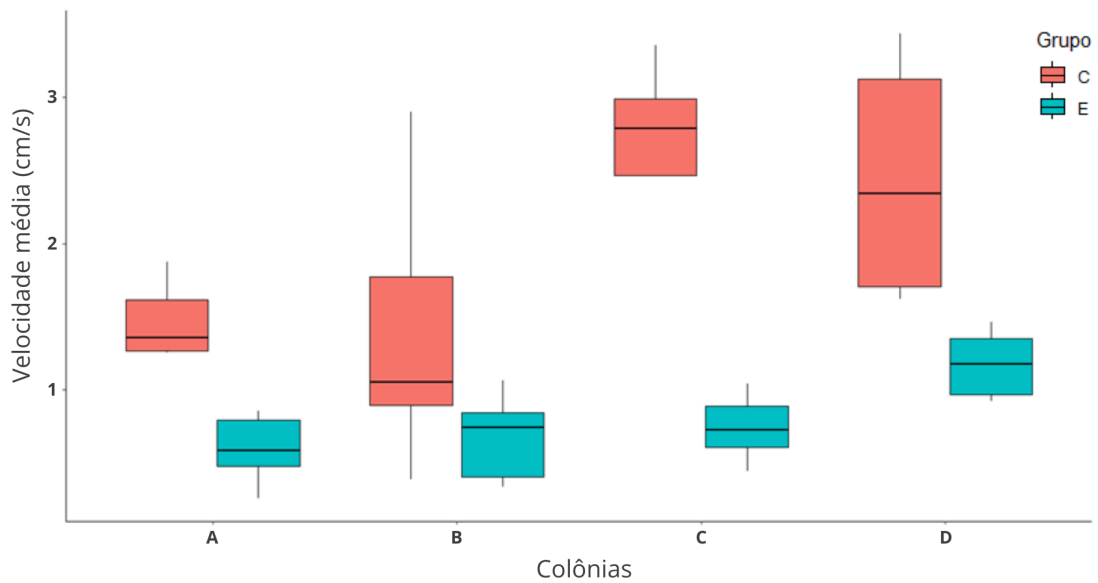
A presença do inseticida flupiradifurona exerce uma influência significativa na velocidade média de *Scaptotrigona postica*, de modo que o inseticida reduz a velocidade dos indivíduos expostos (GLM - gaussian, $F_{(1, 62)} = 59,18$; $p < 0,001$ - Figura 18).

Figura 18 - Velocidade média, em centímetros por segundos, das abelhas *Scaptotrigona postica*. (A) Distribuição dos dados das velocidades médias dos indivíduos. (B) Média \pm desvio padrão da velocidade média. A coluna e os pontos vermelhos representam os indivíduos do grupo controle, e a coluna e os pontos azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.



Além disso, a influência de outros fatores, como a diferença de colônias, os blocos experimentais e os diferentes indivíduos, foram avaliados a fim de compreender outras variáveis que podem afetar a velocidade das abelhas. Entre esses fatores, a diferença da origem das abelhas (colônias) demonstrou ser um aspecto de impacto na variação da velocidade dos indivíduos (GLM - gaussian, $F_{(3, 59)} = 8,94$; $p < 0,001$ - Figura 19). Apesar disso, o inseticida flupiradifurona foi a única influência negativa na velocidade média ($p < 0,001$). De modo que os demais fatores (blocos experimentais e diferentes indivíduos filmados) não apresentam efeitos significativos ($p > 0,05$), o que indica que essas variáveis não foram determinantes para explicar a diminuição observada na velocidade.

Figura 19 - Gráfico boxplot da média de velocidade das operárias forrageiras de *Scaptotrigona postica* em diferentes colônias. As colunas vermelhas representam os indivíduos do grupo controle, e as colunas azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.



4.3.2.2 Distância percorrida

A distância total percorrida pelos indivíduos foi influenciada pela presença do flupiradifurona. As abelhas dos diferentes grupos experimentais exibiram variações nesse parâmetro, sendo que aquelas expostas ao inseticida apresentaram uma redução significativa na distância percorrida (GLM - Gaussiano, $F_{(1, 62)} = 60,71$; $p < 0,001$ - Figura 20). Além disso, os indivíduos que foram expostos ao inseticida exploraram menos a área total da arena de filmagem (Figura 21).

Figura 20 - Distância total percorrida, em centímetros, pelas operárias forrageiras de *Scaptotrigona postica*. (A) Distribuição dos dados das distâncias percorridas pelos indivíduos. (B) Média \pm desvio padrão da distância percorrida. A coluna e os pontos vermelhos representam os indivíduos do grupo controle, e a coluna e os pontos azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.

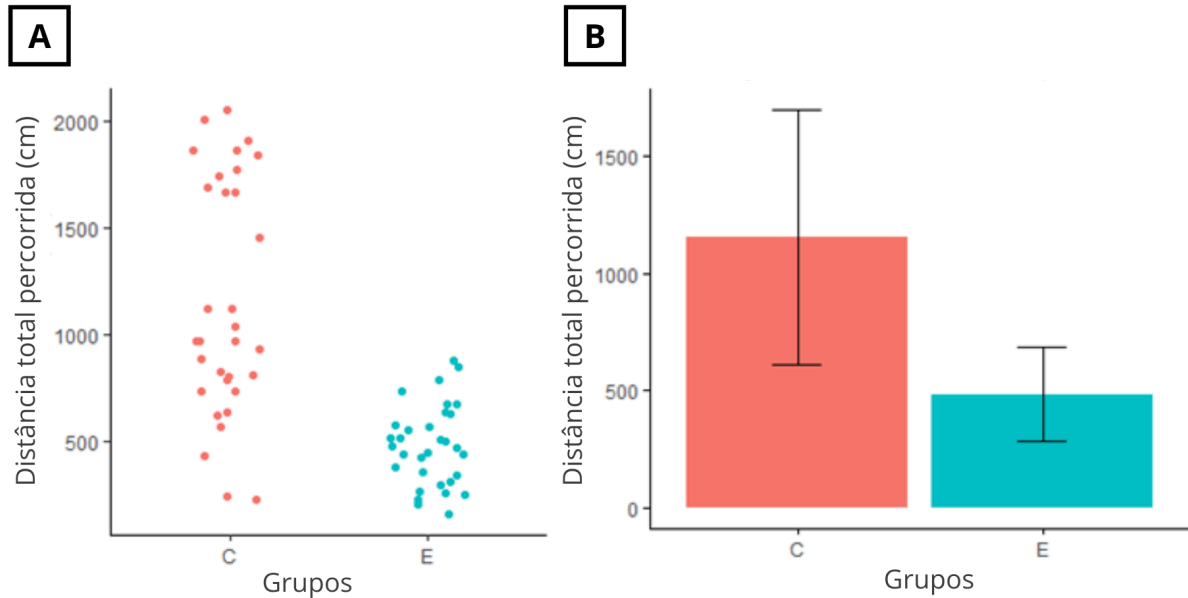
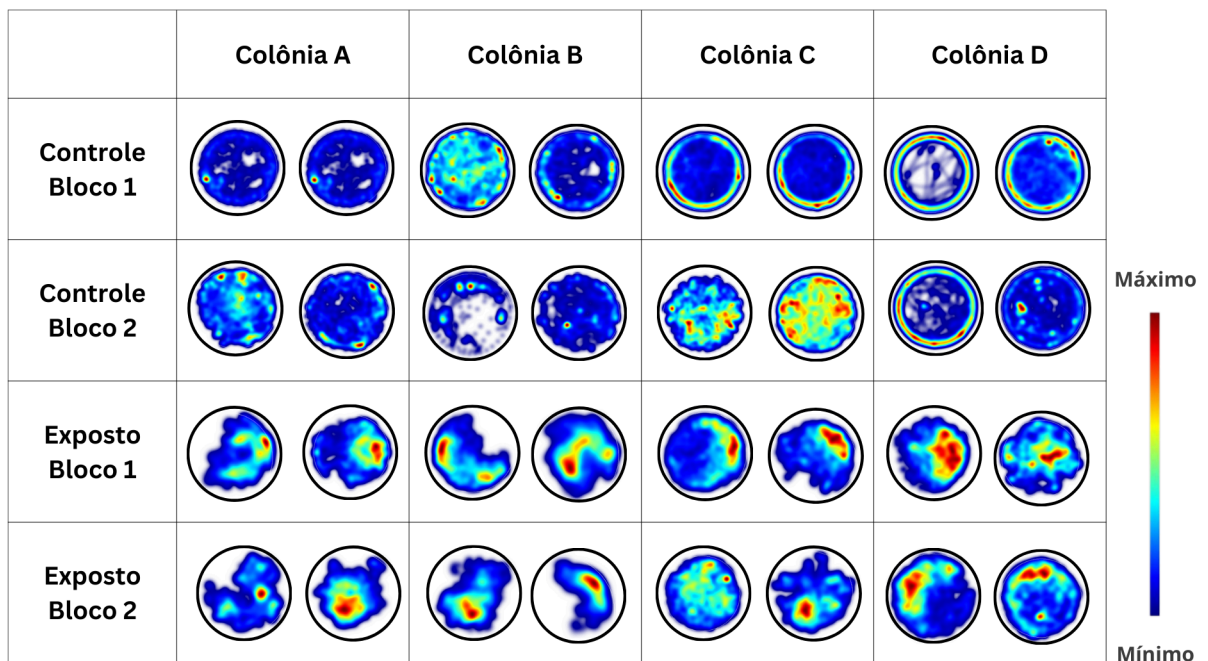


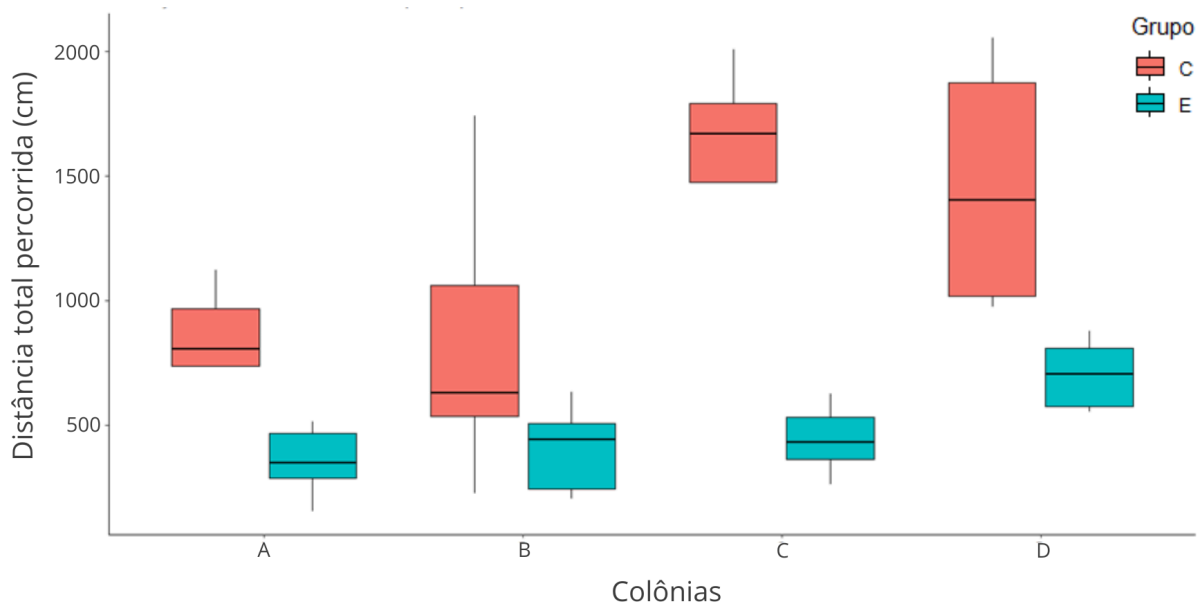
Figura 21 - Mapa de calor de *Scaptotrigona postica* para os diferentes grupos experimentais e colônias nos dois blocos de repetição. Padrão de caminhada de alguns dos indivíduos filmados e frequência de sua posição na arena ao longo do tempo ($t = 10$ min). Sendo que, as áreas em branco são áreas que não foram exploradas.



Ademais, a variação entre colônias, blocos experimentais e diferentes indivíduos filmados foram avaliados como variáveis que poderiam afetar a distância percorrida. A partir

disso, foi possível identificar que a origem das abelhas (colônias) tem efeito na variação da distância total percorrida pelos indivíduos (GLM - gaussian, $F_{(3, 59)} = 9,28$; $p < 0,001$ - Figura 22). Ademais, o fator de interferência negativa na distância percorrida das abelhas é o grupo experimental ($p < 0,001$), sendo que os indivíduos expostos ao flupiradifurona apresentam menor distância percorrida, quando comparados aos indivíduos do controle. E os demais fatores analisados não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$), sugerindo que essas variáveis não tiveram um impacto relevante sobre a distância percorrida.

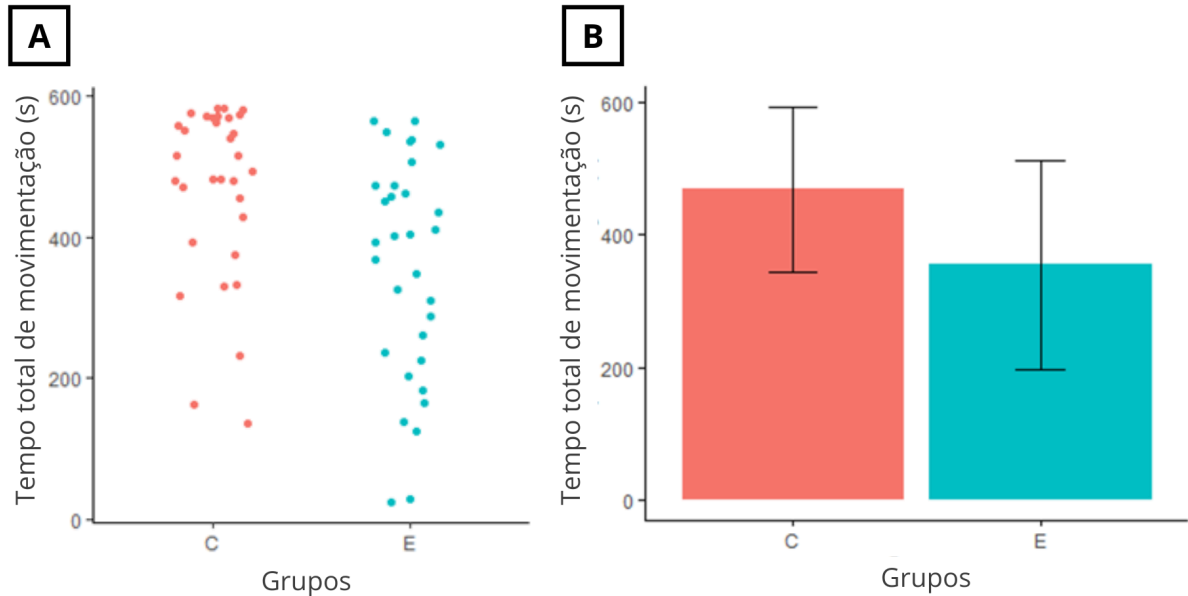
Figura 22 - Gráfico boxplot da distância total percorrida pelas abelhas em diferentes colônias de *Scaptotrigona postica*. As colunas vermelhas representam os indivíduos do grupo controle, e as colunas azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.



4.3.2.3 Tempo de movimentação

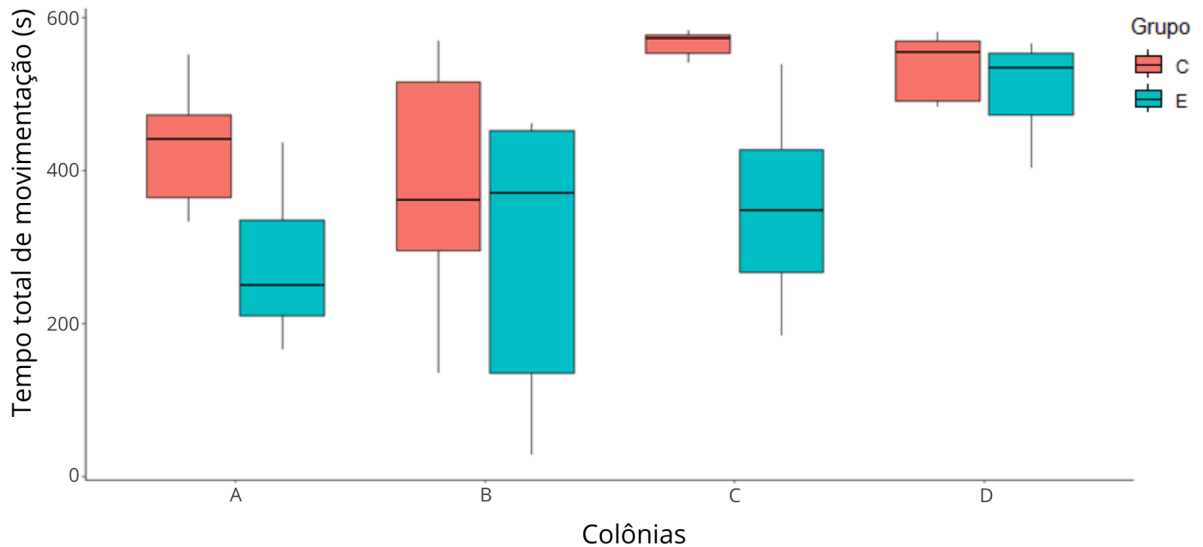
A presença do flupiradifurona é um fator significativo no tempo total de movimentação das abelhas, apresentando variações relevantes nesse comportamento. De modo que, os indivíduos expostos ao inseticida apresentaram redução no tempo de movimentação (GLM - quasipoisson, $F_{(1, 62)} = 12,10$; $p = 0,001$ - Figura 23).

Figura 23 - Tempo total de movimentação, em segundos, de operárias forrageiras de *Scaptotrigona postica*. (A) Distribuição dos dados do tempo total de movimentação dos indivíduos. (B) Média \pm desvio padrão do tempo total de movimentação. A coluna e os pontos vermelhos representam os indivíduos do grupo controle, e a coluna e os pontos azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.



Outros fatores (variação entre colônias, blocos experimentais e diferentes indivíduos filmados) também foram analisados como variáveis que poderiam afetar o tempo de movimentação. A partir disso, a origem das abelhas (colônias) demonstrou ter efeito na variação da movimentação das abelhas filmadas (GLM - quasipoisson, $F_{(3, 59)} = 8,09$; $p < 0,001$ - Figura 24). Apesar disso, o único fator de interferência direta é o grupo experimental ($p < 0,001$), sendo que os indivíduos expostos ao flupiradifurona apresentam menor tempo de movimentação, quando comparados aos indivíduos do controle. E os demais fatores analisados não apresentaram efeitos significativos ($p > 0,05$), sugerindo que essas variáveis não tiveram um impacto relevante sobre o tempo de movimentação.

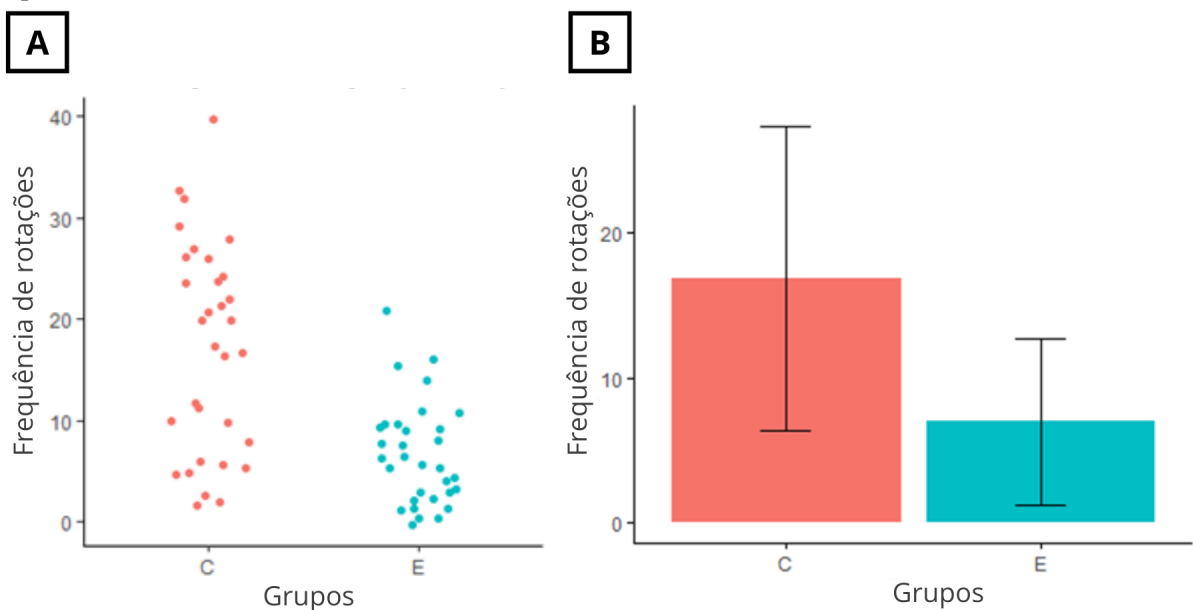
Figura 24 - Gráfico boxplot do tempo total de movimentação das abelhas em diferentes colônias de *Scaptotrigona postica*. As colunas vermelhas representam os indivíduos do grupo controle, e as colunas azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.



4.3.2.4 Frequência de rotações

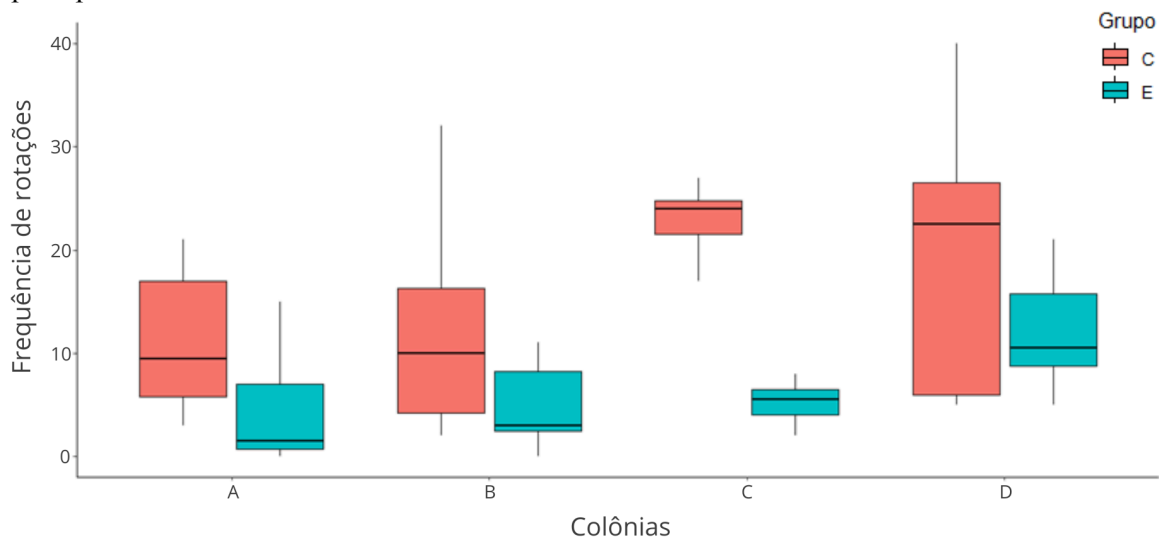
A presença do inseticida flupiradifurona exerce uma influência significativa na frequência de rotações das abelhas, reduzindo a frequência desse comportamento nos indivíduos expostos (GLM - gaussian, $F_{(1, 62)} = 24,58$; $p < 0,001$ - Figura 25).

Figura 25 - Frequência de rotações de operárias forrageiras de *Scaptotrigona postica*. (A) Distribuição dos dados de frequência de rotações dos indivíduos. (B) Média \pm desvio padrão da frequência de rotações. A coluna e os pontos vermelhos representam os indivíduos do grupo controle, e a coluna e os pontos azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.



Além disso, outros fatores como variação entre colônias, blocos experimentais e diferentes indivíduos filmados foram analisados como variáveis que também poderiam afetar a frequência de rotações. A partir disso, observou-se que a origem das abelhas (colônias) tem efeito na variação desse comportamento (GLM - gaussian, $F_{(3, 59)} = 4,48$; $p < 0,01$ - Figura 26). No entanto, os outros fatores não apresentaram efeitos significativos ($P > 0,05$), sugerindo que essas variáveis não tiveram impacto relevante sobre a frequência de rotação das abelhas. Apesar da interferência da variação de colônias, o fator principal de interferência é o grupo experimental ($p < 0,001$), sendo que os indivíduos expostos ao flupiradifurona apresentam menor frequência de rotações, quando comparados aos indivíduos do controle.

Figura 26 - Gráfico boxplot da frequência de rotações das abelhas em diferentes colônias de *Scaptotrigona postica*. As colunas vermelhas representam os indivíduos do grupo controle, e as colunas azuis, os indivíduos do grupo exposto ao inseticida flupiradifurona. C: grupo controle; E: grupo exposto.



4.3.3 Análise histológica

4.3.3.1 Cérebro

A exposição ao flupiradifurona provoca alterações negativas significativas na morfologia dos corpos pedunculados das abelhas expostas ($p < 0,01$ - Figura 27). Foi possível observar um aumento expressivo na distância entre as células de Kenyon (Figura 28). Em relação às células compactadas, a distância média entre as células ultrapassou o dobro no grupo exposto em comparação ao grupo controle ($W = 27297$, $p < 0,01$ - Tabela 5). Já nas

células internas, a distância média entre as células aumentou cerca de 1,9 vezes no grupo exposto em relação ao controle ($W = 45538$, $p < 0,01$ - Tabela 5).

Figura 27 - Distância entre as células de Kenyon de *Scaptotrigona postica* (média \pm desvio padrão). (A) Distância entre as células de Kenyon da área compactada. (B) Distância entre as células de Kenyon da área interna.

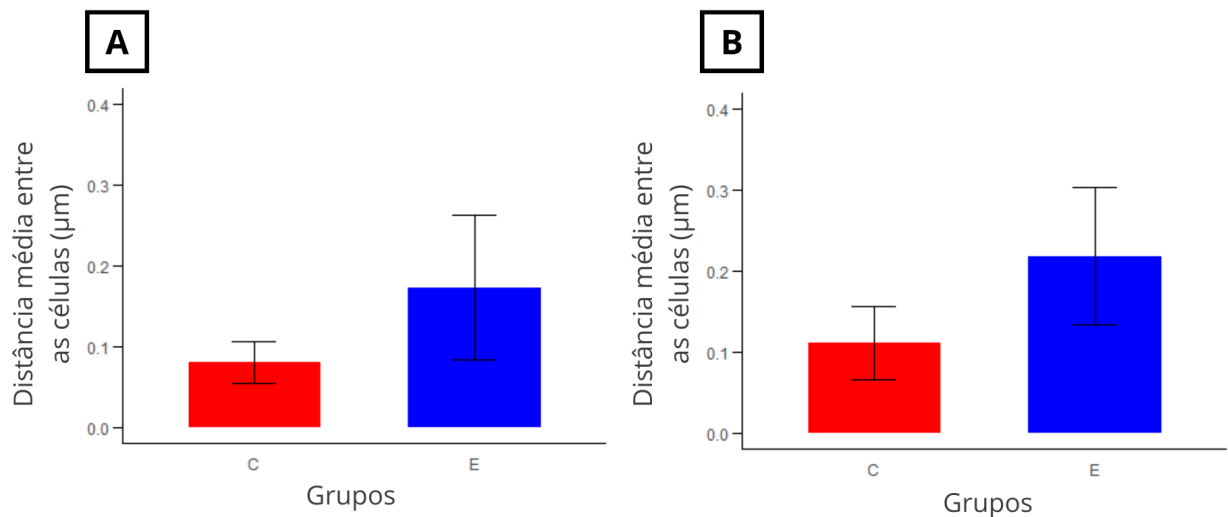


Figura 28 - Cérebro de *Scaptotrigona postica*. (A) Visão geral do cérebro com destaque nos corpos pedunculados analisados (setas pretas) - barra = 20 micrômetros. (B) Células de Kenyon localizadas no corpo pedunculado (asterisco branco - células compactadas; asterisco amarelo - células internas) - barra = 20 micrômetros.

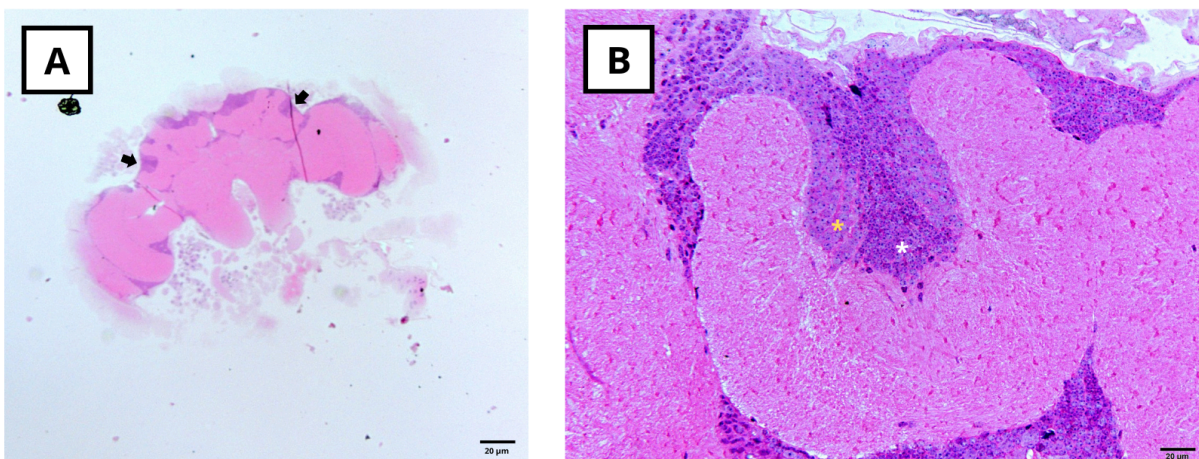


Tabela 5 - Distância média entre as células de Kenyon dos corpos pedunculados (média \pm desvio padrão).

| Grupo | Células de Kenyon internas (μm) | Células de Kenyon compactadas (μm) |
|----------|--|---|
| Controle | 0,111 \pm 0,04 | 0,081 \pm 0,02 |

Exposto

 $0,218 \pm 0,08$ $0,173 \pm 0,09$

4.3.3.2 Intestino

A exposição ao flupiradifurona não influencia negativamente na morfologia do intestino médio das abelhas (GLM - gaussian, $F_{(1, 75)} = 0,37$; $p = 0,55$ - Figura 29). As alterações observadas (Figura 30) no órgão foram semelhantes nos indivíduos de ambos os grupos experimentais, demonstrando que não há diferenças significativas nas alterações no grupo exposto, quando comparado ao controle, de modo que ambos os grupos apresentaram valor de score similar. O score médio dos indivíduos de ambos os grupos foi em torno de 20 (Figura 29), indicando um nível semelhante de alterações. Sendo que, quanto maior o valor do score, maior é a taxa de alterações morfológicas no órgão.

Figura 29 - Score de alterações do intestino de *Scaptotrigona postica* (média \pm desvio padrão). (A) Score por indivíduo analisado do grupo controle. (B) Score por indivíduo analisado do grupo exposto.

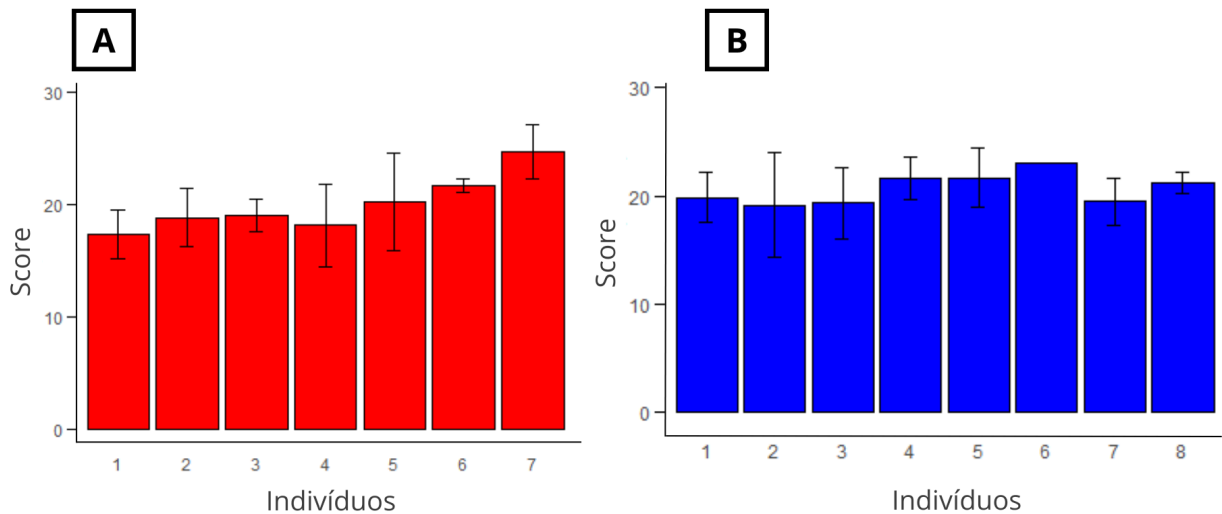
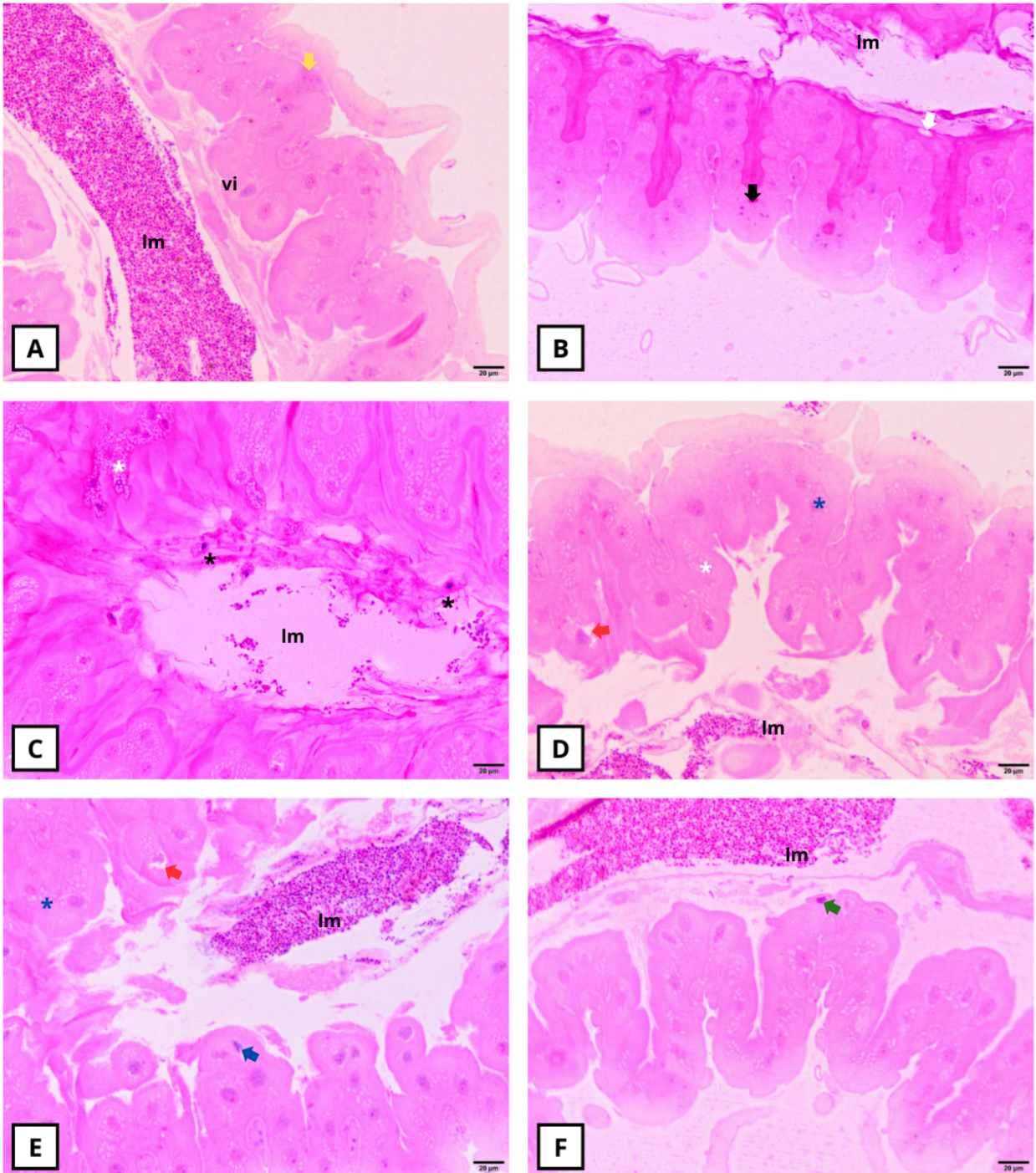


Figura 30 - Alterações morfológicas observadas no intestino médio de *Scaptotrigona postica* (lm = lúmen; barra = 20 micrômetros). (A) Vilosidade (vi) e ninho de células regenerativas em diferenciação (seta amarela). (B) Ninho de células regenerativas sem diferenciação (seta preta) e secreção apócrina (seta branca). (C) Células sendo liberadas para o lúmen (asterisco preto) e vacuolização intermediária (asterisco branco); (D) Diferentes tipos de vacuolizações analisadas - vacuolização degenerativa (seta vermelha com contorno preto), vacuolização intermediária (asterisco azul) e vacuolização simples (asterisco branco). (E) Vacuolização degenerativa (seta vermelha), vacuolização intermediária (asterisco azul com contorno preto) e célula digestiva com cromatina compactada (seta azul). (F) Célula digestiva com núcleo picnótico (seta verde).



Observando as alterações de acordo com o fator de importância. A frequência das alterações de importância mínima foi semelhante nos grupos experimentais, não havendo efeitos do flupiradifurona ($p > 0,087$; Figura 31). Exceto a diferenciação das células dos ninhos regenerativos, em que foi visto maior diferenciação das células nos indivíduos expostos ao inseticida ($p = 0,049$). Em relação às alterações com fator de importância moderado, a frequência das alterações foi semelhante em ambos os grupos experimentais, não sendo observado efeitos do flupiradifurona ($p > 0,114$; Figura 32). E as alterações com fator de importância severo, a frequência das alterações também foi semelhante nos grupos experimentais, não sendo observado efeitos do flupiradifurona ($p > 0,056$; Figura 33).

Figura 31 - Índices de lesão (IL) das alterações morfológicas de baixa importância patológica (média \pm desvio padrão). (A) Vacuolização simples. (B) Vacuolização intermediária. (C) Liberação de células para o lúmen. (D) Secreção apócrina. (E) Núcleo de células regenerativas com cromatina compactada. (F) Núcleo de células digestivas com cromatina compactada. (G) Diferenciação dos ninhos de células regenerativas.

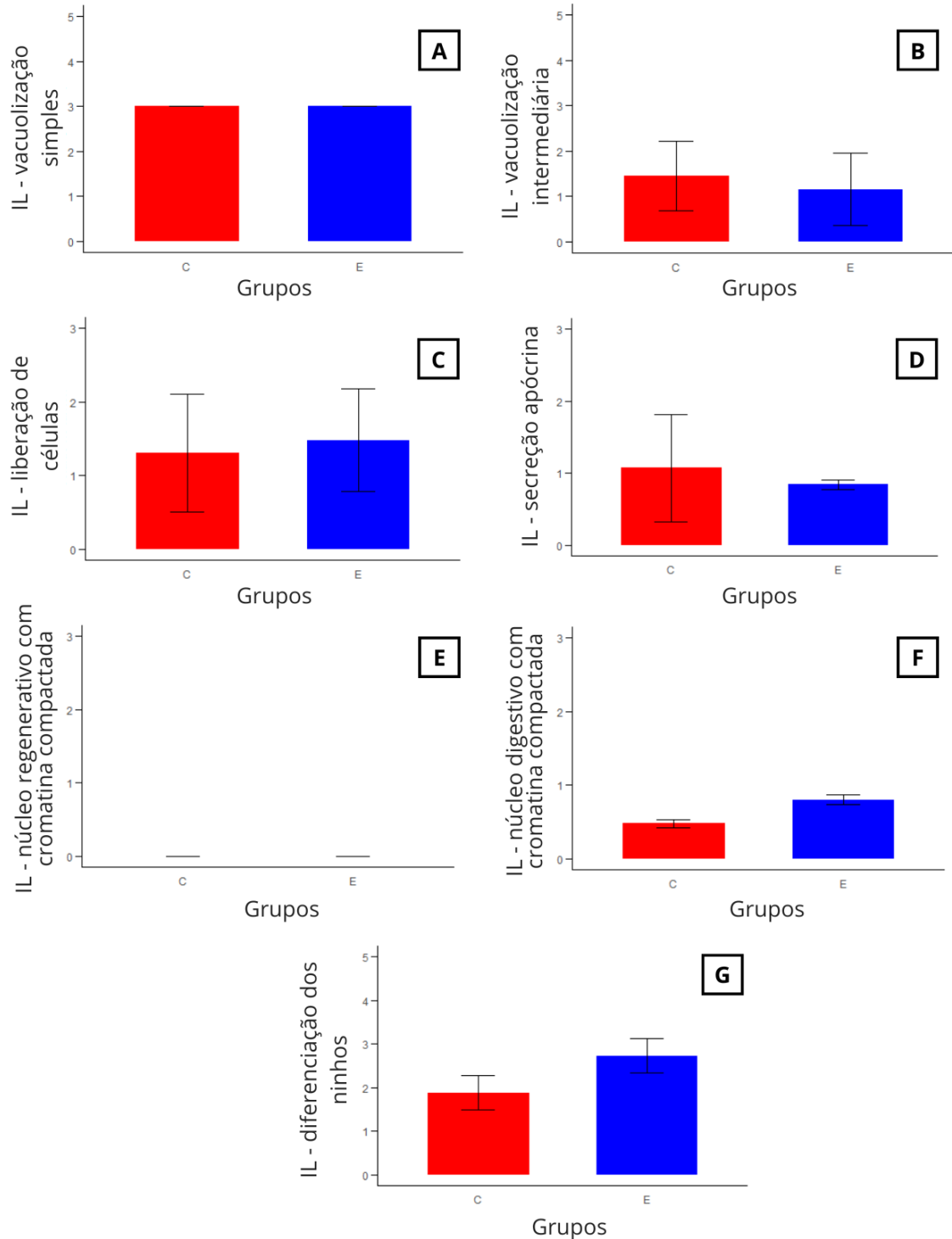


Figura 32 - Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de importância patológica moderada (média \pm erro padrão). (A) Núcleo picnótico em células digestivas. (B) Vacuolização degenerativa.

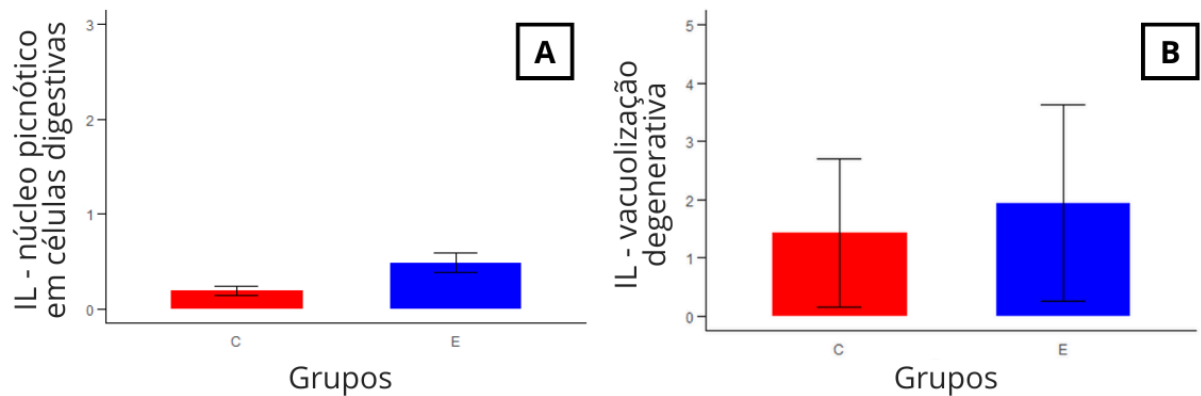
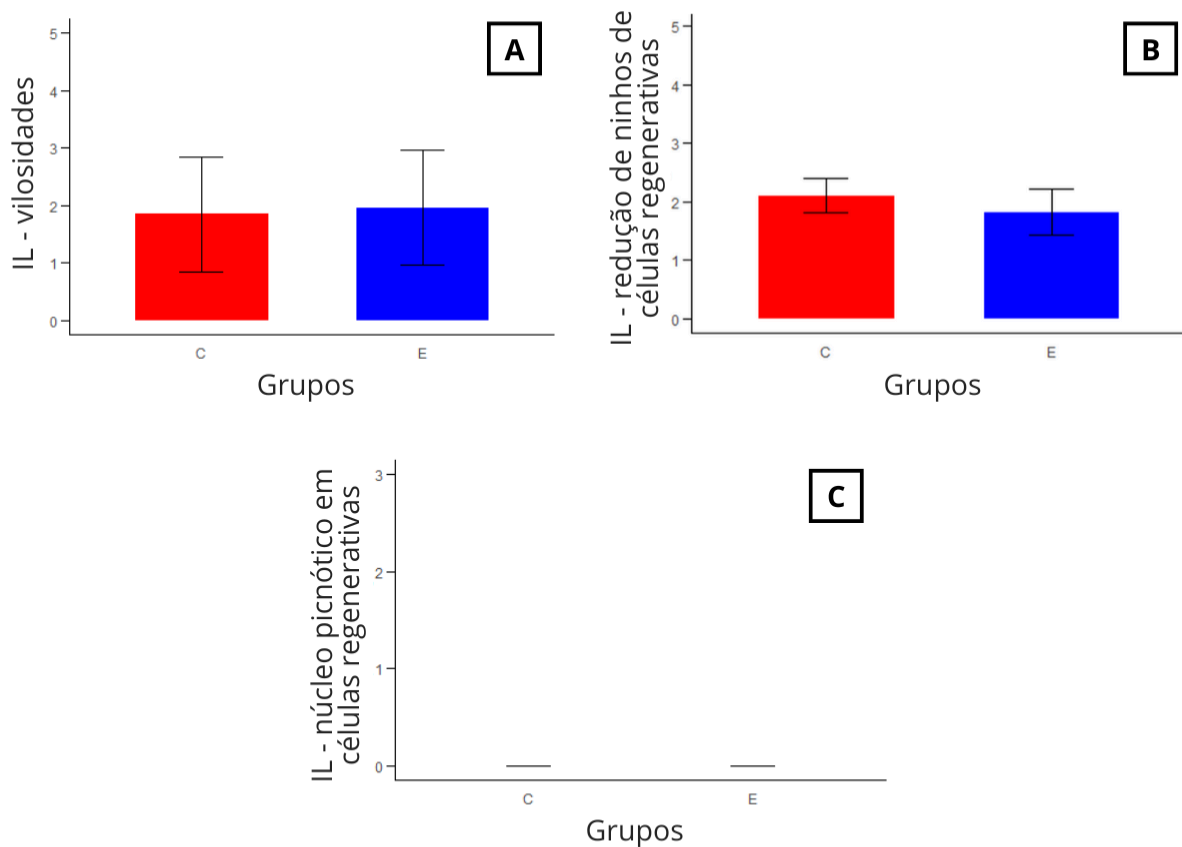


Figura 33 - Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de alta importância patológica (média \pm erro padrão). (A) Vilosidades. (B) Redução na quantidade de ninhos de células regenerativas. (C) Núcleo picnótico em células regenerativas.



4.4 DISCUSSÃO

A partir dos resultados do presente trabalho foi possível observar que a exposição oral crônica a uma concentração ambientalmente relevante do flupiradifurona (FPF) afeta a

morfologia dos corpos pedunculados do cérebro de *Scaptotrigona postica*, onde os indivíduos expostos apresentam um aumento de até duas vezes na distância entre as células de Kenyon (compactadas e internas), quando comparados com o grupo controle, indicando o impacto substancial do FPF. Os corpos pedunculados são formados, principalmente, pelas células de Kenyon, sendo subdivididas em células compactadas e células internas (Cruz-Landim, 2009). Essa região está relacionada às características sensoriais, de aprendizado, memória, socialização e integração de estímulos das abelhas (Menzel, 2012), de modo que são essenciais para reconhecimento e memória de fontes alimentares e retorno à colônia (Menzel, 2012). Sendo assim, mudanças estruturais nos corpos pedunculados podem comprometer o comportamento exploratório e memória das abelhas, resultando em prejuízos individuais e coletivos (Devaud *et al.*, 2007; Groh *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos corroboram com Chen *et al.* (2024), onde os autores observaram alterações no cérebro de *Apis mellifera* recém-emergidas após exposição oral crônica a 12 mg/L de FPF. Os indivíduos expostos tiveram alterações celulares em genes relacionados à memória, impactando a eficiência alimentar e reduzindo a sensibilidade à sacarose (Chen *et al.*, 2024). Tais resultados indicam que o FPF impacta diretamente em funções cognitivas das abelhas (Chen *et al.*, 2024), o que leva a alterações em atividades essenciais para a performance das abelhas forrageiras (Menzel *et al.*, 2005).

No entanto, em contrapartida, Hesselbach e Scheiner (2019) não observaram danos nas células de Kenyon de *A. mellifera* recém-emergidas expostas cronicamente a 1,0 µg/abelha/dia do FPF. Porém, as abelhas expostas iniciaram atividades de forrageamento mais cedo (Hesselbach; Scheiner, 2019). Essa variância de resultados pode acontecer devido a diferentes fatores como diferença de espécies (Lopes; Nocelli; Monquero, 2024) e capacidade de acúmulo de toxinas (Groh *et al.*, 2012), além do desenvolvimento cerebral, já que a plasticidade neural varia ao longo do ciclo de vida das abelhas (Groh *et al.*, 2012). Além disso, a concentração do inseticida em que os indivíduos foram expostos também pode influenciar nos resultados (Chen *et al.*, 2024; Tosi; Nieh, 2019). Porém, ainda há escassez de estudos a respeito dos efeitos do FPF no cérebro das abelhas, sendo que a maioria dos trabalhos existentes são com *Apis mellifera* (Chen *et al.*, 2024; Hesselbach; Scheiner, 2018, 2019).

Como consequência das alterações morfológicas observadas no cérebro devido a exposição ao FPF, seja um impacto direto ou a partir de uma reação em cadeia, há alteração no comportamento de locomoção das abelhas, de modo que a presença do inseticida reduziu

todos os parâmetros analisados (velocidade média, distância percorrida, tempo de movimentação e frequência de rotações) nas operárias forrageiras de *Scaptotrigona postica*. A diminuição desses fatores pode ser justificada pelo modo de ação do FPF, tendo em vista que esse é um inseticida neurotóxico, ao se ligar aos canais de sódio nas células nervosas (Nauen *et al.*, 2014) causa perturbação na propagação dos impulsos nervosos (Casida, 2018; Madesh *et al.*, 2024) resultando em efeitos negativos na coordenação e movimento dos insetos, através de tremores, prostração e paralisia (Silva, 2021), resultando na desorientação, dificuldade de locomoção e comportamentos semelhantes (Tosi *et al.*, 2021). Ademais, pode influenciar em outros comportamentos, como coordenação de movimento, hiperatividade ou redução de movimento e ação de curvar o abdômen para baixo (Tosi *et al.*, 2021).

Tendo em vista que, o FPF pode ser encontrado nas colônias de abelhas por até cinco meses após a aplicação (EPA, 2014), ao expor subespécies de *Apis mellifera* de diferentes regiões da Europa e América do Norte às concentrações realistas de campo do FPF, que poderiam ser encontradas ao longo do tempo após a exposição (11,1; 33,2; 100,6; 292,5; 730,5 ng/abelha/dia) (Tosi *et al.*, 2021). Os autores demonstraram que essa exposição leva a falta de coordenação dos movimentos com maior frequência, em todas as concentrações analisadas, resultado semelhante ao visto neste trabalho, tendo em vista os indivíduos expostos ao FPF apresentaram alterações nos parâmetros de locomoção, onde todos tiveram resultados reduzidos, demonstrando a apatia já observada por Tosi *et al.* (2021).

Além disso, apesar das alterações neste trabalho terem sido observadas após uma exposição crônica (7 dias de exposição), Tosi *et al.* (2021) propõe que as abelhas podem ser eficientes na desintoxicação do FPF. Como mudanças comportamentais podem ser observadas logo após 15 min de exposição (Hesselbach; Scheiner, 2019), é possível que as alterações aqui observadas foram minimizadas pela capacidade de desintoxicação das abelhas. Tendo em vista que, as vias de desintoxicação das abelhas e outros insetos em relação ao FPF ainda não foram estudadas, há a possibilidade de compreender como podem responder a uma exposição constante a essa substância. As moscas-branca (*Trialeurodes vaporariorum*), por exemplo, é uma espécie de inseto que com o passar do tempo desenvolveu resistência a algumas substâncias tóxicas (Jin *et al.*, 2023). Quando expostas ao FPF, após algumas gerações, a resistência das moscas aumentou em 15 vezes, além do que, as atividades das enzimas oxidase multifuncional, carboxilesterase e glutathione S-transferase aumentaram significativamente, sendo que todas essas enzimas estão relacionadas, de alguma forma, ao processamento de xenobióticos no organismo (Jin *et al.*, 2023), ou seja, as moscas podem ser

capazes de realizar a desintoxicação ao FPF. Além disso, dezenas de genes relacionados às enzimas desintoxicantes foram detectados em quantidades mais altas que o normal (Jin *et al.*, 2023). Baseado nisso, e nos resultados encontrados, é possível levantar a hipótese de que os indivíduos usados no presente estudo podem fazer parte de uma geração mais resistente a esse xenobiótico.

Em contrapartida ao que foi proposto sobre a capacidade de desintoxicação de abelhas adultas ao FPF (Tosi *et al.*, 2021), Chen *et al.* (2024) mostrou que em abelhas *Apis mellifera* recém-emergidas, os indivíduos expostos de forma crônica a 12 mg/L não são capazes de realizar essa desintoxicação, apresentando desregulação desse processo. De modo geral, nas abelhas, as vias de desintoxicação podem ser divididas em três fases, onde enzimas do processo de biotransformação (citocromos P450, carboxilesterases e glutathione S-transferases) realizam reações a fim de mitigar os efeitos prejudiciais de substâncias tóxicas (Berenbaum; Johnson, 2015). Sendo assim, tendo em vista que as abelhas podem ser capazes de realizar desintoxicação de substâncias tóxicas (Berenbaum; Johnson, 2015), como agrotóxicos, a capacidade de realização desse processo pode depender de diferentes fatores como idade e função/casta das abelhas, além da concentração da substância exposta (Chen *et al.*, 2024; Silva, 2021; Tosi; Nieh, 2019).

Apesar da possibilidade de desintoxicação, os comportamentos anormais observados podem alterar temporariamente a eficiência e aptidão das abelhas, podendo resultar em diferentes impactos (Tosi *et al.*, 2021), ou seja, a exposição que levou a alterações na locomoção pode levar a dificuldade da abelha em voltar para colônia (Henry *et al.*, 2015). E essa dificuldade pode reduzir a eficiência no forrageamento, podendo levar ao enfraquecimento da colônia e dos serviços de polinização (Tsvetkov *et al.*, 2017). Sendo assim, a compreensão dos impactos das alterações comportamentais em nível de colônia é de grande importância (Tosi *et al.*, 2021).

Além disso, os resultados encontrados mostraram que as diferentes origens das abelhas (colônia) podem influenciar na variação de todos os parâmetros observados no comportamento de locomoção. Essa variação pode estar relacionada às diferentes composições genéticas dos organismos (Robinson; Fernald; Clayton, 2008), o que pode impactar na expressão de traços comportamentais (Rueppell; Pankiw; Page, 2004). Tendo em vista que as colônias utilizadas nos experimentos do presente trabalho são não-irmãs, os diferentes fatores genéticos de cada colônia podem ter papel fundamental na modulação do comportamento das abelhas, incluindo a resposta a estímulos ambientais e padrões de

locomoção (Robinson; Fernald; Clayton, 2008; Rueppell; Pankiw; Page, 2004). Além disso, a variabilidade genética entre as colônias pode impactar não só de forma individual, mas também na dinâmica social (Oldroyd; Fewell, 2007). Dessa forma, pode-se dizer que a origem genética das abelhas foi determinante na resposta dos indivíduos à exposição ao FPF, resultando na variação comportamental.

Apesar disso, essas alterações não foram capazes de levar os indivíduos à morte, não impactando diretamente nas abelhas de forma individual, mas pode impactar o coletivo da colônia. Já que, apesar dos efeitos cerebrais, e consequentemente alterações no comportamento, o FPF não reduziu a sobrevivência das abelhas, resultado este semelhante a outros estudos, onde não foi visto alterações na mortalidade dos indivíduos de *Apis mellifera* tratados com FPF em doses únicas de ingestão aguda (Hesselbach; Scheiner, 2018, 2019). Em contrapartida, um estudo realizado com *Apis mellifera* apresentou resultados onde a presença desse inseticida aumentou a mortalidade das abelhas em uma exposição crônica de uma concentração de 0,4 mg/kg (Tosi *et al.*, 2021), ou seja, o estudo utilizou uma concentração dez vezes menor do que a utilizada no presente trabalho.

Além disso, o estudo em que houve redução na sobrevivência foi realizado com *Apis mellifera* europeia recém-emergida (Tosi *et al.*, 2021), levando em consideração que a idade e função das abelhas pode influenciar na resistência a diferentes fatores (Campana, 2023) essa diferença entre espécies e idade das abelhas pode justificar essa variância de resultados. Porém, a ausência da interferência do FPF visto neste trabalho corrobora com a hipótese de Tosi e Nieh (2019), em que a influência do inseticida varia de acordo com a estação do ano e idade das abelhas, de modo que o inseticida é mais tóxico para as forrageiras e durante o verão. Sendo assim, o período e localidade em que os demais estudos foram realizados, pode resultar em dados variados.

Além da exposição crônica, a exposição aguda também pode interferir na sobrevivência (Chakrabarti *et al.*, 2020), além do paladar (Hesselbach; Scheiner, 2018, 2019), cognição (Hesselbach; Scheiner, 2018, 2019) e habilidades motoras (Hesselbach; Scheiner, 2018, 2019) das abelhas. Além disso, a exposição ao FPF pode influenciar no consumo de alimentos (Tong *et al.*, 2019; Tosi; Nieh, 2019; Tosi *et al.*, 2021), o que não foi observado neste trabalho, de modo que ambos os grupos experimentais apresentaram consumo diário e total semelhante, não tendo diferença significativa.

Ademais, foi demonstrado que a interação entre os fatores estressores parasita (forídeo) e o inseticida flupiradifurona não interferem diretamente na sobrevivência das

abelhas, mas devido a diferentes condições, a presença desses parasitas, como fator isolado, pode aumentar a mortalidade das abelhas. Como já demonstrado que são inimigos naturais das abelhas (Cella; Cunha, 2020; Pereira *et al.*, 2012), é importante manter as colônias fortes e saudáveis, para que a presença desses parasitas não interfira negativamente na colônia (Pereira *et al.*, 2012). Além disso, vale lembrar que a interação entre diferentes agentes estressores pode levar ao aumento dos efeitos do FPF nas abelhas (Tosi; Nieh, 2019).

Apesar dos impactos neurológicos e comportamentais, o flupiradifurona não alterou a morfologia do intestino médio dos indivíduos expostos, de modo que ambos os grupos experimentais apresentaram índice de lesão semelhante. Tendo em vista que o intestino médio é a região do sistema digestivo onde ocorre a maior parte da digestão dos alimentos e da absorção dos nutrientes (Cruz-Landim, 2009), alterações morfológicas nessa região podem comprometer a absorção de nutrientes, levar a desnutrição dos indivíduos e conseqüentemente morte (Molina; Pelissari; Feirhmann, 2013).

Porém, os resultados encontrados no presente trabalho são opostos ao encontrado na literatura, em que indivíduos recém-emergidos de *Apis mellifera* expostos cronicamente a 12 mg/L de FPF apresentaram alterações celulares no intestino (Chen *et al.*, 2024). De modo que as células digestivas apresentaram maior quantidade de vacúolos e núcleos desintegrados (Chen *et al.*, 2024). Sendo esse o único estudo encontrado relacionado a efeitos morfológicos causados pelo FPF no intestino de abelhas. Essa ausência de pesquisas e resultados pode estar relacionado ao fato de que o FPF é um inseticida neurotóxico, ou seja, os estudos geralmente não avaliam órgãos que primeiramente entram em contato com o FPF por via oral (intestino) e acabam focando no órgão-alvo de forma que a conhecer efeitos do FPF no sistema nervoso dos polinizadores.

Além disso, embora neste trabalho o índice de lesão tenha sido semelhante em ambos os grupos experimentais, houve o aumento na diferenciação dos ninhos de células regenerativas nos indivíduos expostos, demonstrando uma alta taxa de atividade celular nas abelhas (Cruz-Landim; Costa-Leonardo, 1996). Esse aumento na diferenciação sugere que, apesar de não ter diferença de lesão entre os grupos, o organismo das abelhas expostas está em maior atividade de renovação epitelial por meio da produção de novas células para substituir as danificadas que provavelmente foram eliminadas para o lúmen e, portanto, manter o intestino funcionando corretamente (Cruz-Landim; Costa-Leonardo, 1996). Esse mecanismo de renovação celular é uma resposta adaptativa do epitélio intestinal frente ao estresse gerado pelo xenobiótico. Apesar disso, a estimativa da quantidade de células

liberadas no lúmen intestinal foi semelhante nos dois grupos. Esse resultado pode estar relacionado ao tempo de digestão do alimento ingerido. Nas abelhas, o alimento demora aproximadamente 2 horas para passar pelo intestino médio e chegar no intestino posterior para ser evacuado (Cruz-Landim, 2009). Sendo assim, é possível que no momento em que as abelhas foram dissecadas, o alimento consumido já tinha sido digerido e direcionado para o intestino posterior, levando junto as células liberadas que se acumularam no seu lúmen.

Com base nos resultados encontrados e na literatura, os efeitos de agrotóxicos, como o FPF, dependem de múltiplos fatores, uma vez que essas substâncias interagem com diferentes variáveis durante seu uso (Rocha, 2012). A concentração da substância, a idade, função/casta e espécie das abelhas (Chen *et al.*, 2024; Hesselbach; Scheiner, 2018, 2019; Silva, 2021; Tosi; Nieh, 2019) são exemplos de variáveis que estão diretamente ligadas aos efeitos desse inseticida.

Vale ressaltar que o FPF é considerado uma opção menos tóxica às abelhas e outros organismos não-alvo, quando comparado aos neonicotinoides. Ambos são inseticidas neurotóxicos, ou seja, agem no sistema nervoso dos insetos (Matsuda *et al.*, 2001; Nauen *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2024), sendo agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), o que causa hiperexcitação e morte (Matsuda *et al.*, 2001; Nauen *et al.*, 2014; Tomizawa; Casida; 2005), mas apresentam diferenças na estrutura química, modo de ação e perfil toxicológico (Matsuda *et al.*, 2001; Nauen *et al.*, 2014; Tomizawa; Casida; 2005). Os neonicotinoides são derivados sintéticos da nicotina, que se ligam fortemente aos receptores, causando ativação constante dos neurônios, o que resulta em efeitos letais e subletais (Simon-Delson *et al.*, 2015). Além disso, possui grande afinidade aos receptores e alto potencial tóxico, sendo frequentemente relacionado ao desenvolvimento de resistência de pragas a esses inseticidas (Bass *et al.*, 2015).

Já o FPF foi desenvolvido para superar as limitações dos neonicotinoides, sendo baseado em um butenolídeo ligado a outros grupos funcionais específicos que aumentam sua solubilidade em água e estabilidade química (Nauen *et al.*, 2014). Esse inseticida também age nos receptores de nAChRs, mas não possui grande afinidade, realizando uma ligação moderada, com uma ação prolongada e menos intensa (Nauen *et al.*, 2014). Ou seja, apesar da semelhança, o FPF possui menor potencial tóxico devido a seu modo de ação, não induzindo a efeitos negativos tão rapidamente (Hesselbach *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

Apesar de ambos os inseticidas causarem efeitos letais e subletais (Hesselbach; Scheiner, 2019; Rundlöf *et al.*, 2015; Siviter *et al.*, 2024; Tosi *et al.*, 2021). Os

neonicotinoides são amplamente documentados como tóxicos para organismos não-alvo, como as abelhas. O flupiradifurona, apesar de apresentar diferentes efeitos nas abelhas, varia bastante dependendo da dose/concentração, espécie, condições ambientais, entre outros fatores (Chen *et al.*, 2024; Ferreira, 2010; Hesselbach; Scheiner, 2018, 2019; Silva, 2021; Tosi; Nieh, 2019). Ao comparar os resultados do presente estudo com a literatura, não é possível encontrar dados totalmente semelhantes, o que reforça a ideia de que os efeitos do FPF podem variar de acordo com diversos fatores.

Zhang *et al.* (2022), mostrou que em concentrações iguais (10 µg/L) o imidacloprido (neonicotinoide) e o FPF apresentam resultados completamente diferentes, de modo que o imidacloprido reduz significativamente o consumo de alimento dos indivíduos expostos, além de retardar o período de postura de ovos e desenvolvimento das larvas. Já o FPF não reduziu ou bloqueou nenhum dos parâmetros analisados (Zhang *et al.*, 2022). Corroborando com a teoria de que o FPF, apesar de neurotóxico, como os neonicotinoides, apresenta efeitos variados, não induzindo a efeitos negativos tão rapidamente (Hesselbach *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022).

Ademais, baseado nos resultados do presente trabalho, a alteração cerebral causada pelo FPF gera impactos na locomoção, mas não leva à morte dos indivíduos ou efeitos no intestino médio, podendo assim, ser considerado menos tóxico para as abelhas, quando comparamos com os efeitos causados pelos neonicotinoides mesmo em concentrações extremamente baixas (Silva *et al.*, 2016; Tosi; Nieh, 2019). Destaca-se ainda que os efeitos gerados nos indivíduos podem impactar na relação coletiva, de modo que essas alterações podem afetar em diferentes aspectos da vida das abelhas. Além disso, esses são os primeiros resultados do efeito do inseticida flupiradifurona na sobrevivência, comportamento e morfologia do cérebro e intestino de adultos de *Scaptotrigona postica*, o que auxilia na elucidação de lacunas a respeito desse inseticida em abelhas nativas sem ferrão.

Porém, as alterações observadas reforçam a necessidade de investigar detalhadamente os danos associados à exposição de insetos polinizadores a esse inseticida. Sendo fundamental investigar os efeitos a longo prazo, considerando diferentes variáveis.

4.5 CONCLUSÃO

Em condições laboratoriais, a exposição ao inseticida flupiradifurona impacta a morfologia dos corpos pedunculados do cérebro de *Scaptotrigona postica*, aumentando a

distância entre as células que formam a sua porção neuronal interna. Essas mudanças podem ser refletidas em alterações comportamentais, onde todos os parâmetros analisados da locomoção foram reduzidos. No entanto, a exposição ao inseticida não é um fator significativo na sobrevivência dos indivíduos, ao contrário dos forídeos, os quais podem aumentar a mortalidade das abelhas. Além disso, a exposição ao flupiradifurona não provoca mudanças na morfologia do intestino médio de *S. postica*.

Esses resultados destacam a importância de analisar agrotóxicos como um fator de estresse significativo no desempenho das abelhas, o que destaca a complexidade da interação entre agrotóxicos, parasitas e condições ambientais na eficiência dos polinizadores, como as abelhas.

4.6 REFERÊNCIAS

AL NAGGAR, Y.; BAER, B. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

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

ANTONINI, Y.; COSTA, R. G.; MARTINS, R. P. Floral preferences of a neotropical stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponina) in an urban forest fragment. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2a, p. 463–471, 2006.

ARCE, A. N. *et al.* Foraging bumblebees acquire a preference for neonicotinoid-treated food with prolonged exposure. **Proceedings. Biological sciences**, v. 285, n. 1885, p. 20180655, 2018.

AYALA, R.; GONZALEZ, V. H.; ENGEL, M. S. Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, distribution, and indigenous knowledge. Em: **Pot-Honey**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 135–152.

AZEVEDO, P.; NOCELLI, R. C. F. Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. **Revista de Biologia**, v. 20, n. 1, 2020.

BASS, C. *et al.* The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 51, p. 41–51, 2014.

BAYER, S. A. **Sivanto Prime 200 SL [Bula]**. [s.l: s.n.].

BECKER, T.; PEQUENO, P. A. C. L.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Impact of environmental temperatures on mortality, sex and caste ratios in *Melipona interrupta* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **The Science of Nature**, v. 105, n. 9–10, 2018.

BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current opinion in insect science**, v. 10, p. 51–58, 2015.

BERNET, D. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v. 22, n. 1, p. 25–34, 1999.

BLACQUIÈRE, T. *et al.* Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 21, n. 4, p. 973–992, 2012.

CAMPANA, L. **Expressão diferencial de genes relacionados à imunidade em abelhas sem ferrão (Meliponini): a relação entre o estado do sistema imunológico e o comportamento agressivo**. [s.l.] USP (Universidade de São Paulo), 2023.

CASIDA, J. E. Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: Progress and prospects. **Annual review of entomology**, v. 63, n. 1, p. 125–144, 2018.

CASUSO, N. A.; MORTENSEN, A. N.; ELLIS, J. D. Zombie fly - *Apocephalus borealis* Brues (Insecta: Diptera: Phoridae). **Entomology and Nematology Department, University of Florida**, 2014.

CELLA, I.; CUNHA, R. D. **Manejos para o controle de doenças, pragas e predadores das abelhas *Apis mellifera* no sul do Brasil**. [s.l.] Florianópolis: Epagri. Boletim Didático, 2020.

CHAM, K. et al. **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. 2. ed. [s.l.] Brasília: IBAMA/DIQUA, 2020.

CHEN, J. *et al.* Multiple stresses induced by chronic exposure to flupyradifurone affect honey bee physiological states. **The Science of the total environment**, v. 935, n. 173418, p. 173418, 2024.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: São Paulo: Editora UNESP, 2009.

CRUZ-LANDIM, C.; COSTA-LEONARDO, A. M. Ultrastructure of cell renewal in the midgut of termites. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 129–130, 1996.

D'AVILA, M.; MARCHINI, L. C. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. **Boletim de industria animal**, v. 62, n. 1, p. 79–90, 2005.

DEVAUD, J.-M. *et al.* Neural substrate for higher-order learning in an insect: Mushroom bodies are necessary for configural discriminations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 43, 2015.

EFSA PANEL ON PLANT PROTECTION PRODUCTS AND THEIR RESIDUES (PPR) *et al.* Statement on the active substance flupyradifurone. **EFSA journal**, v. 20, n. 1, p. e07030, 2022.

EL-DIN, H. S. *et al.* Chronic exposure to a field-realistic concentration of Closer® SC (24% sulfoxaflor) insecticide impacted the growth and foraging activity of honey bee colonies. **Apidologie**, v. 53, n. 2, 2022.

EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). **Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench, and Seed Treatment Uses of the New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960)**. [s.l.] EPA Washington D.C, 2014.

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual review of entomology**, v. 51, n. 1, p. 209–232, 2006.

FERREIRA, R. A. C. **Análise Morfológica e Histoquímica do Corpo Gorduroso e dos Túbulos de Malpighi de Operárias Adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) Tratadas com Fipronil e Ácido Bórico**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, 2010.

FREITAS, P. V. D. X. *et al.* Declínio populacional das abelhas polinizadoras: Revisão. **PUBVET**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2017.

FREITAS, B. M. *et al.* Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 332–346, 2009.

GIRÓN LÓPEZ, M. C.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; VARGAS-HERNÁNDEZ, M. Variación en la expresión de genes de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) por exposición a una dosis subletal de flupiradifurona. **Acta biológica colombiana**, v. 28, n. 3, p. 376–384, 2023.

GODFRAY, H. C. J. *et al.* Food security: The challenge of feeding 9 billion people. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 2010.

GRELLA, T. C. *et al.* Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. **Chemosphere**, v. 236, n. 124255, p. 124255, 2019.

GROH, C.; TAUTZ, J.; RÖSSLER, W. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 12, p. 4268–4273, 2004.

HESSELBACH, H. *et al.* Chronic exposure to the pesticide flupyradifurone can lead to premature onset of foraging in honeybees *Apis mellifera*. **The journal of applied ecology**, v. 57, n. 3, p. 609–618, 2020.

HESSELBACH, H.; SCHEINER, R. Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

HESSELBACH, H.; SCHEINER, R. The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 28, n. 3, p. 354–366, 2019.

HUNG, K.-L. J. *et al.* Non-native honey bees disproportionately dominate the most abundant floral resources in a biodiversity hotspot. **Proceedings. Biological sciences**, v. 286, n. 1897, p. 20182901, 2019.

JACOB, C. R. O. *et al.* The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 224, p. 65–70, 2019a.

JACOB, C. R. O. *et al.* Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology (London, England)**, v. 28, n. 7, p. 744–753, 2019b.

JAFFÉ, R. *et al.* Landscape genomics to the rescue of a tropical bee threatened by habitat loss and climate change. **Evolutionary applications**, v. 12, n. 6, p. 1164–1177, 2019.

JIN, Y. *et al.* Detoxification enzymes associated with flupyradifurone resistance in greenhouse whitefly. **Zeitschrift für angewandte Entomologie [Journal of applied entomology]**, v. 147, n. 8, p. 630–640, 2023.

KLEIN, A. M., FREITAS, B. M., BOMFIM, I. G., BOREUX, V., FORNOFF, F., & OLIVEIRA, M. O. **A polinização agrícola por insetos no Brasil: Um Guia para**

Fazendeiros, Agricultores, Extensionistas, Políticos e Conservacionistas. [s.l.] Nature Conservation and Landscape Ecology, 2020.

KLEIN, A.-M. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings. Biological sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303–313, 2007.

LIMA, M. A. P. *et al.* Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of comparative physiology**, v. 202, n. 9–10, p. 733–747, 2016.

LOPES, L. T.; NOCELLI, R. C. F.; MONQUERO, P. A. Os impactos dos herbicidas em abelhas nativas brasileiras. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 102–122, 2024.

LUZ, C. F. P. *et al.* Floral resources and risk of exposure to pesticides for *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier 1836 in a Cerrado of São Paulo (Brazil). **Grana**, v. 57, n. 5, p. 377–400, 2018.

MADESH, K. *et al.* Mode of Action of Novel Insecticides. **Advanced Trends in Plant Protection**, p. 255–291, 2024.

MATSUDA, K. *et al.* Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 22, n. 11, p. 573–580, 2001.

MCGREGOR, S. E. **Insect pollination of cultivated crop plants.** [s.l.] Department of Agriculture, 1976.

MENZEL, R. *et al.* Honey bees navigate according to a map-like spatial memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 8, p. 3040–3045, 2005.

MENZEL, R. The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 13, n. 11, p. 758–768, 2012.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. [s.l.] JHU Press, 2007.

MOLINA, G.; PELISSARI, F.; FEIRHMANN, A. C. Consequências da desnutrição proteica para o trato gastrointestinal. **MUDI**, v. 13, p. 12–24, 2013.

NAUEN, R. *et al.* Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. **Pest management science**, v. 71, n. 6, p. 850–862, 2014.

NICHOLLS, C. I.; ALTIERI, M. A. Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. **Agronomy for sustainable development**, v. 33, n. 2, p. 257–274, 2013.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. [s.l.] São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.

NUNES, W. C. *et al.* Neonicotinoids versus bees: A brief review on the effects on these pollinators and the need for reevaluation of agricultural practices. **ARACÊ**, v. 6, n. 4, 2024.

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

OLDROYD, B. P.; FEWELL, J. H. Genetic diversity promotes homeostasis in insect colonies. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 8, p. 408–413, 2007.

OLIVEIRA, C. R. *et al.* Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. **Chemosphere**, v. 236, n. 124282, p. 124282, 2019.

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

PALMER, M. J. *et al.* Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2013.

PEREIRA, F. M. *et al.* **Manejo de colônias de abelhas-sem-ferrão**. [s.l.] Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2012.

PISA, L. W. *et al.* Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 1, p. 68–102, 2015.

RIBEIRO, G. S.; PANETTI, C. DA S.; COSTA, I. S. Controle agroecológico de forídeos em Abelhas Sem Ferrão. **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Setor de Apicultura e Meliponicultura**, 2016.

ROBINSON, G. E.; FERNALD, R. D.; CLAYTON, D. F. Genes and social behavior. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5903, p. 896–900, 2008.

ROCHA, M. C. DE L. E. S. DE A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento**. [s.l.] Brasília: Ibama, 2012.

RUNDLÖF, M. *et al.* Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 77–80, 2015.

RÜPPELL, O.; PANKIW, T.; PAGE, R. E., Jr. Pleiotropy, epistasis and new QTL: the genetic architecture of honey bee foraging behavior. **The journal of heredity**, v. 95, n. 6, p. 481–491, 2004.

SANTOS, F. M. DOS; CARVALHO, C. A. L. DE; SILVA, R. F. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em uma área de transição Cerrado-Amazônia. **Acta amazonica**, v. 34, n. 2, p. 319–328, 2004.

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

SILVA, P. R. M. DA. **Efeito letal de flupiradifurona sobre *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae) em condições de laboratório.** [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso: Universidade Federal de Campina Grande, 2021.

SILVA, M. *et al.* Efeitos do imidacloprido sobre o comportamento das abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). **Revista Cincia Tecnologia & Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 21–28, 2016.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza Online**, v. 10, n. 3, p. 146–152, 2012.

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**, p. 696–703, 2012.

SIMON-DELSO, N. *et al.* Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 2015.

SIVITER, H. *et al.* A novel pesticide has lethal consequences for an important pollinator. **The Science of the total environment**, v. 952, n. 175935, p. 175935, 2024.

SOUZA, H. R. DE *et al.* Espectro polínico da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) em Barra do Corda, MA, Brasil. **Acta amazonica**, v. 45, n. 3, p. 307–316, 2015.

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

TADEI, R.; MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis*

mellifera and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. **Environmental pollution**, v. 267, n. 115622, p. 115622, 2020.

TAN, K. *et al.* The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

TOMÉ, H. V. V. *et al.* Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38406, 2012.

TOMÉ, H. V. V. *et al.* Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, p. 103–109, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 45, n. 1, p. 247–268, 2005.

TONG, L.; NIEH, J. C.; TOSI, S. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, v. 237, n. 124408, p. 124408, 2019.

TOSI, S. *et al.* Long-term field-realistic exposure to a next-generation pesticide, flupyradifurone, impairs honey bee behaviour and survival. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2021.

TOSI, S.; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. **Proceedings. Biological sciences**, v. 286, n. 1900, p. 20190433, 2019.

TSVETKOV, N. *et al.* Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6345, p. 1395–1397, 2017.

WATANABE, M. E. Pollination worries rise as honey bees decline. *Science (New York, N.Y.)*, v. 265, n. 5176, p. 1170–1170, 1994.

WU-SMART, J.; SPIVAK, M. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. *Scientific reports*, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016.

ZHANG, Q. *et al.* Impacts of Imidacloprid and Flupyradifurone Insecticides on the Gut Microbiota of *Bombus terrestris*. *Agriculture*, v. 12, n. 3, p. 389, 2022.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, em condições laboratoriais, o inseticida flupiradifurona altera a morfologia dos corpos pedunculados do cérebro de *Scaptotrigona postica*, levando a impactos no comportamento de locomoção dos indivíduos, reduzindo todos os parâmetros analisados. Porém não é um fator de impacto significativo na sobrevivência e morfologia do intestino das abelhas, ao contrário dos forídeos, os quais podem aumentar a mortalidade das abelhas.

Sendo assim, os resultados encontrados confrontam parte da hipótese inicial, de modo que, apesar do flupiradifurona ter efeitos no cérebro e locomoção de *S. postica*, essa interferência não é um fator que afeta a sobrevivência das abelhas e morfologia do intestino médio de *S. postica*.

Ademais, esses resultados destacam a importância do flupiradifurona como um fator de estresse significativo no desempenho das abelhas, o que destaca a complexidade da interação entre agrotóxicos, parasitas e condições ambientais na eficiência dos polinizadores, como as abelhas.

REFERÊNCIAS

Abelha-mandaguari (Scaptotrigona postica). Disponível em: <<https://www.biodiversity4all.org/taxa/418525-Scaptotrigona-postica>>. Acesso em: 2 out. 2024.

AGUIAR, A. P. *et al.* Order Hymenoptera. *Zootaxa*, v. 3703, n. 1, p. 51, 2013.

AL NAGGAR, Y.; BAER, B. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

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

ANTONINI, Y.; COSTA, R. G.; MARTINS, R. P. Floral preferences of a neotropical stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponina) in an urban forest fragment. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2a, p. 463–471, 2006.

ARAÚJO, R. D. S. *et al.* Spinosad-mediated effects on survival, overall group activity and the midgut of workers of *Partamona helleri* (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 175, p. 148–154, 2019.

ARCE, A. N. *et al.* Foraging bumblebees acquire a preference for neonicotinoid-treated food with prolonged exposure. **Proceedings. Biological sciences**, v. 285, n. 1885, p. 20180655, 2018.

AYALA, R.; GONZALEZ, V. H.; ENGEL, M. S. Mexican stingless bees (Hymenoptera: Apidae): Diversity, distribution, and indigenous knowledge. Em: **Pot-Honey**. New York, NY: Springer New York, 2013. p. 135–152.

AZEVEDO, P.; NOCELLI, R. C. F. Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. **Revista da Biologia**, v. 1, p. 10–20, 2020.

BAYER. **Bayer amplia leque de soluções para citros com Sivanto Prime (2022)**. Disponível em: <<https://www.agro.bayer.com.br/nossa-bayer/release-sivanto-prime>>. Acesso em: 6 out. 2024.

BAYER, S. A. **Sivanto Prime 200 SL [Bula]**, 2022.

BAYER. **Sivanto Prime® da Bayer tem extensão de bula para mais 42 culturas de frutas e vegetais.** Disponível em: <<https://www.bayer.com.br/pt/midia/sivanto-prime-bayer-extensao-bula-mais-42-culturas-frutas-vegetais>>. Acesso em: 14 out. 2024.

BECKER, T.; PEQUENO, P. A. C. L.; CARVALHO-ZILSE, G. A. Impact of environmental temperatures on mortality, sex and caste ratios in *Melipona interrupta* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **The Science of Nature**, v. 105, n. 9–10, 2018.

BICKER, G.; SCHÄFER, S.; REHDER, V. Chemical neuroanatomy of the honeybee brain. Em: **Neurobiology and Behavior of Honeybees**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1987. p. 202–224.

BLACQUIÈRE, T. *et al.* Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 21, n. 4, p. 973–992, 2012.

BOMFIM, I. G. A.; DE OLIVEIRA, M. O.; FREITAS, B. M. **Curso Técnico em Apicultura - Biologia das Abelhas**. Ceará: MEDIOTec, 2017.

BORTOLOTTI, L. *et al.* Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 63–67, 2003.

BRANDT, R. *et al.* Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **The Journal of comparative neurology**, v. 492, n. 1, p. 1–19, 2005.

BRITO, P. *et al.* The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. **Environmental science and pollution research international**, v. 27, n. 31, p. 38654–38661, 2020.

CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21086, 2011.

CARNEIRO, L. S. *et al.* The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 189, n. 109991, p. 109991, 2020.

CASIDA, J. E. Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: Progress and prospects. **Annual review of entomology**, v. 63, n. 1, p. 125–144, 2018.

CASUSO, N. A.; MORTENSEN, A. N.; ELLIS, J. D. Zombie fly - *Apocephalus borealis* Brues (Insecta: Diptera: Phoridae). **Entomology and Nematology Department, University of Florida**, 2014.

CATAE, A. F. *et al.* Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Ecotoxicology (London, England)**, v. 27, n. 2, p. 109–121, 2018.

CELLA, I.; CUNHA, R. D. **Manejos para o controle de doenças, pragas e predadores das abelhas *Apis mellifera* no sul do Brasil**. Florianópolis: Epagri. Boletim Didático, 151, 2020.

CHAKRABARTI, P. *et al.* Field rates of Sivanto™ (flupyradifurone) and Transform® (sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.). **PloS one**, v. 15, n. 5, p. e0233033, 2020.

CHAM, K. DE O. *et al.* **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. [s.l.] Brasília: Ibama/Diqua, 2017.

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

CHMIEL, J. A. *et al.* Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honey bees: A role for probiotics as mediators of environmental stress. **Frontiers in ecology and evolution**, v. 8, 2020.

COELHO, D. DE A. **Efeito de inseticidas na sobrevivência e capacidade de voo da abelha africana *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)**. Dissertação (Mestrado): Universidade Federal de Campina Grande, 2021.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

D'AVILA, M.; MARCHINI, L. C. Polinização realizada por abelhas em culturas de importância econômica no Brasil. **Periódicos Brasileiros em Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2005.

DORIGO, A. S. **Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e melíferas ao flupiradifurona**. Tese (Doutorado): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2022.

DUDLEY, N.; ALEXANDER, S. Agriculture and biodiversity: a review. **Biodiversity (Nepean, Ont.)**, v. 18, n. 2–3, p. 45–49, 2017.

EDENFELD, G.; STORK, T.; KLÄMBT, C. Neuron-glia interaction in the insect nervous system. **Current opinion in neurobiology**, v. 15, n. 1, p. 34–39, 2005.

EFSA *et al.* Statement on the active substance flupyradifurone. **EFSA Journal**, v. 20, n. 1, 2022.

EL-DIN, H. S. *et al.* Chronic exposure to a field-realistic concentration of Closer® SC (24% sulfoxaflor) insecticide impacted the growth and foraging activity of honey bee colonies. **Apidologie**, v. 53, n. 2, 2022.

EMBRAPA. II Curso sobre Biologia e Manejo de Meliponíneos para Polinização de Plantas de Interesse Agrícola Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. **Embrapa**, 2018.

EMBRAPA; AMAZÔNIA ORIENTAL. **Inimigos Naturais & Cuidados Especiais**. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/documents/1355163/39571288/Roteiro+Te%C3%B3rica+-+Cuidados+Especiais.pdf/4fd9e18e-34ea-638c-250b-73c2241e6f07>>. Acesso em: 7 out. 2024.

EPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for Foliar, Soil Drench, and Seed Treatment Uses of the New Insecticide Flupyradifurone (BYI 02960). **EPA Washington D.C., 20460**, 2014.

FABRICIUS, J. C. **Systema Piezatorum: secundum ordines, genera, species, adiectis synonymis, locis, observationibus, descriptionibus**. Brunsvigae: Carolum Reichard, 1804.

FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual review of entomology**, v. 51, n. 1, p. 209–232, 2006.

FAO; VANDAME, J. **Conservation and Management of Pollinators For Sustainable Agriculture through an Ecosystem Approach**. [s.l.] FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome, 2006.

FERNANDES, K. M. *et al.* Quantitative analysis of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 56, p. 489–506, 2010.

FREITAS, B. M. *et al.* Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 332–346, 2009.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A importância econômica da polinização. **Mensagem Doce**, v. 80, p. 44–46, 2005a.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A importância econômica da polinização. **Mensagem Doce, São Paulo**, v. 80, p. 44–46, 2005b.

FREITAS, P. V. D. X. DE *et al.* Declínio populacional das abelhas polinizadoras: Revisão. **PUBVET**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2017.

FUNDECITRUS. Relatório de Atividades. **Fundo de Defesa da Citricultura -Junho 2021/Maio 2022**, p. 73, 2022.

FURLAN, L. *et al.* An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 3: alternatives to systemic insecticides. **Environmental science and pollution research international**, v. 28, n. 10, p. 11798–11820, 2021.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 105–108, 2012.

GODFRAY, H. C. J. *et al.* Food security: The challenge of feeding 9 billion people. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5967, p. 812–818, 2010.

GOULSON, D. Effects of introduced bees on native ecosystems. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, v. 34, n. 1, p. 1–26, 2003.

GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science (New York, N.Y.)**, v. 347, n. 6229, 2015.

GRELLA, T. C. *et al.* Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. **Chemosphere**, v. 236, n. 124255, p. 124255, 2019.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the insects**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2005.

GUO, Y. *et al.* The effects of exposure to flupyradifurone on survival, development, and foraging activity of honey bees (*Apis mellifera* L.) under field conditions. **Insects**, v. 12, n. 4, p. 357, 2021.

HEISENBERG, M. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 1998.

HENRY, M. *et al.* Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. **Proceedings. Biological sciences**, v. 282, n. 1819, p. 20152110, 2015.

HESSELBACH, H.; SCHEINER, R. The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 28, n. 3, p. 354–366, 2019.

HUNG, K.-L. J. *et al.* Non-native honey bees disproportionately dominate the most abundant floral resources in a biodiversity hotspot. **Proceedings. Biological sciences**, v. 286, n. 1897, 2019.

JACOB, C. R. O. *et al.* Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*: Stingless bee treated with fipronil. **Pest management science**, v. 71, n. 1, p. 114–122, 2014.

JACOB, C. R. O. *et al.* Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology (London, England)**, v. 28, n. 7, p. 744–753, 2019a.

JACOB, C. R. O. *et al.* The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 224, p. 65–70, 2019b.

JAFFÉ, R. *et al.* Landscape genomics to the rescue of a tropical bee threatened by habitat loss and climate change. **Evolutionary applications**, v. 12, n. 6, p. 1164–1177, 2019.

JESCHKE, P.; NAUEN, R. Neonicotinoids-from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest management science**, v. 64, n. 11, p. 1084–1098, 2008.

JIN, Y. *et al.* Detoxification enzymes associated with flupyradifurone resistance in greenhouse whitefly. **Zeitschrift für angewandte Entomologie [Journal of applied entomology]**, v. 147, n. 8, p. 630–640, 2023.

KERR, W. E. Biologia e manejo de tíuba: a abelha do Maranhão. **São Luís: EDUFMA**, p. 156, 1996.

KERR, W. E. As abelhas e o meio ambiente. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 12., 1998, Salvador. Nordeste: a grande opção da apicultura brasileira - anais. **Salvador: CBA: FAABA**, p. 27–30, 1998.

KERR, W. E. *et al.* Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. **Parcerias Estratégicas**, v. 12, p. 20–41, 2001.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. Abelha urucu: biologia, manejo e conservação. **Belo Horizonte: Fundação Acangau (Coleção Manejo da Vida Silvestre, 2)**, p. 144, 1996.

KERR, W. E.; CUNHA, R. A. Sex determination in bees. XXVI. Masculinism of workers in the Apidae. **Revista Brasileira de Genética**, v. 13, n. 3, p. 479–489, 1990.

KIYA, T.; KUNIEDA, T.; KUBO, T. Increased neural activity of a mushroom body neuron subtype in the brains of forager honeybees. **PloS one**, v. 2, n. 4, p. e371, 2007.

KLEIN, A. *et al.* **A polinização agrícola por insetos no Brasil**. [s.l.] Ed. Scribus, 2020.

KLEIN, A.-M. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings. Biological sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303–313, 2007.

KOMISCHKE, B. *et al.* Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. **The European journal of neuroscience**, v. 21, n. 2, p. 477–485, 2005.

KRUPKE, C. H. *et al.* Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e29268, 2012.

LATREILLE, P. A. Genera Crustaceorum et Insectorum. **Paris: A. Koenig**, v. 3, p. 155–157, 1807.

LIMA, M. A. P. *et al.* Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology**, v. 202, n. 9–10, p. 733–747, 2016.

LÓPEZ, M. C. G.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; VARGAS-HERNÁNDE, M. Variación en la expresión de genes de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) por exposición a una dosis subletal de flupiradifurona. **Acta Biologica Colombiana**, v. 28, n. 3, p. 376–384, 2023.

LUZ, C. F. P. DA *et al.* Floral resources and risk of exposure to pesticides for *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier 1836 in a Cerrado of São Paulo (Brazil). **Grana**, v. 57, n. 5, p. 377–400, 2018.

MADESH, K. *et al.* Mode of Action of Novel Insecticides. **Advanced Trends in Plant Protection**, p. 255–291, 2024.

MCGREGOR, S. E. **Insect pollination of cultivated crop plants**. [s.l.] Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 1976.

MEDRZYCKI, P. *et al.* **Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses**. Disponível em: <<http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol56-2003-059-062medrzycki.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2024.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 1 ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2000.

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

MIOTELO, L. *et al.* A food-ingested sublethal concentration of thiamethoxam has harmful effects on the stingless bee *Melipona scutellaris*. **Chemosphere**, v. 288, n. 132461, p. 132461, 2022.

MOURE, J. S.; DANÚNCIA, U.; MELO, G. A. R. **Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the neotropical region**. Curitiba: Sociedade Brasileira de Entomologia, 2007.

MOURE, J. S.; SAKAGAMI, S. As mamangavas sociais do Brasil (*Bombus* Latr.) (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomologica**, v. 5, p. 65–194, 1962.

MULLIN, C. A. *et al.* High levels of miticides and agrochemicals in north American apiaries: Implications for honey bee health. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010.

NAUEN, R. *et al.* Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. **Pest management science**, v. 71, n. 6, p. 850–862, 2014.

NICHOLLS, C. I.; ALTIERI, M. A. Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. **Agronomy for sustainable development**, v. 33, n. 2, p. 257–274, 2013.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.

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

OLAND, L. A.; TOLBERT, L. P. Key interactions between neurons and glial cells during neural development in insects. **Annual review of entomology**, v. 48, n. 1, p. 89–110, 2003.

OLIVEIRA, C. R. *et al.* Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. **Chemosphere**, v. 236, n. 124282, p. 124282, 2019.

OLIVEIRA CRUZ, D.; OLIVEIRA CAMPOS, A. Polinização Por abelhas em cultivos protegidos. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 15, n. 1–4, 2009.

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

PARADIS, D. *et al.* Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 406, n. 2, p. 621–633, 2014.

PAULK, A. C.; GRONENBERG, W. Higher order visual input to the mushroom bodies in the bee, *Bombus impatiens*. **Arthropod structure & development**, v. 37, n. 6, p. 443–458, 2008.

PEREIRA, F. D. M. *et al.* **Manejo de colônias de abelhas-sem-ferrão**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2012.

PETTIS, J. S. *et al.* Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. **The Science of Nature**, v. 99, n. 2, p. 153–158, 2012.

PILLING, E. *et al.* A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77193, 2013.

PISA, L. W. *et al.* Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 1, p. 68–102, 2014.

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

Regulamento (CE) N.º 1107/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de Outubro de 2009. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1107>>. Acesso em: 7 out. 2024.

RIBEIRO, G. S.; PANETTI, C. DA S.; COSTA, I. S. Controle agroecológico de forídeos em Abelhas Sem Ferrão. **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – Setor de Apicultura e Meliponicultura**, 2016.

ROAT, T. C.; CRUZ-LANDIM, C. DA. Differentiation of the honey bee (*Apis mellifera* L.) antennal lobes during metamorphosis: a comparative study among castes and sexes. **Animal biology (Leiden, Netherlands)**, v. 61, n. 2, p. 153–161, 2011.

ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. Cambridge: Cambridge University, 1989.

RUNDLÖF, M. *et al.* Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 77–80, 2015.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees – A risk assessment. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014.

SANTOS, F. M. DOS; CARVALHO, C. A. L. DE; SILVA, R. F. Diversidade de abelhas (Hymenoptera: Apoidea) em uma área de transição Cerrado-Amazônia. **Acta amazonica**, v. 34, n. 2, p. 319–328, 2004.

SANTOS, T. DA C. A. DOS; CRUZ-LANDIM, C. DA. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. **Revista brasileira de zoologia**, v. 19, n. 3, p. 703–714, 2002.

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

SILVA, C. I. *et al.* **Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras no Brasil**. 1. ed. [s.l.] Fortaleza, CE: Editora Fundação Brasil Cidadão, 2014.

SILVA, M. B. *et al.* Efeitos do imidacloprido sobre o comportamento das abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). **Revista Cincia Tecnologia & Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 21–28, 2016.

SILVA, P. R. M. **Efeito letal de flupiradifurona sobre *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae) em condições de laboratório.** Pombal-PB: Unidade Acadêmica de Ciências Agrárias do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2021.

SILVA, W.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, 2012.

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**, p. 696–703, 2012.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação.** 1. ed. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira. Ministério do Meio Ambiente (PROBIO - PNUD) & Fundação Araucária, 2002.

SIVITER, H. *et al.* A novel pesticide has lethal consequences for an important pollinator. **The Science of the total environment**, v. 952, 2024.

SOUZA, H. R. DE *et al.* Espectro polínico da própolis de *Scaptotrigona aff. postica* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) em Barra do Corda, MA, Brasil. **Acta amazonica**, v. 45, n. 3, p. 307–316, 2015.

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

TADEI, R.; MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis*

mellifera and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. **Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)**, v. 267, n. 115622, p. 115622, 2020.

TAN, K. *et al.* The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

TOMÉ, H. V. V. *et al.* Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38406, 2012.

TOMÉ, H. V. V. *et al.* Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, v. 124, p. 103–109, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 45, n. 1, p. 247–268, 2005.

TONG, L.; NIEH, J. C.; TOSI, S. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, v. 237, 2019.

TOSI, S. *et al.* Long-term field-realistic exposure to a next-generation pesticide, flupyradifurone, impairs honey bee behaviour and survival. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2021.

TOSI, S.; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. **Proceedings. Biological sciences**, v. 286, 2019.

TSVETKOV, N. *et al.* Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science (New York, N.Y.)**, v. 356, n. 6345, p. 1395–1397, 2017.

WATANABE, M. E. Pollination worries rise as honey bees decline. **Science (New York, N.Y.)**, v. 265, n. 5176, p. 1170–1170, 1994.

WITTER, S. *et al.* **As abelhas e a agricultura**. [s.l.] Porto Alegre: EDIPUCRS, 2014.

WU-SMART, J.; SPIVAK, M. Sub-lethal effects of dietary neonicotinoid insecticide exposure on honey bee queen fecundity and colony development. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016.

YAMAMOTO, I.; CASIDA, J. E. (EDS.). **Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor**. Tokyo: Springer Japan, 1999.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo Hematoxilina e eosina (H.E)

2,5 gramas do corante eosina amarelada 5% foi dissolvido em 500 mL de água destilada, após a homogeneização adicionou-se 1 mL de ácido acético glacial e a solução foi homogeneizada. Antes do uso, a solução de eosina e de hematoxilina foram filtradas. Os cortes foram hidratados por 10 minutos em água destilada, seguido da imersão em hematoxilina (formulação comercial) por 20 minutos. Os cortes foram lavados em água corrente e em seguida colocados na solução de eosina 0,5% por 2 minutos, seguida de lavagem em água destilada. Após os cortes secarem em temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com DPX-Mount.