



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

Marília Fernandes Giroto

EFEITOS SUBLETAIS DO CLORANTRANILIPROLE EM *Bombus morio* (Swederus, 1787): ANÁLISE DE ÓRGÃOS-ALVO E NÃO ALVO

ARARAS/SP
Fevereiro/2026

MARÍLIA FERNANDES GIROTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente da Universidade Federal de São Carlos, Campus de Araras, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientadora: Profa. Dr^a. Roberta
Cornélio Ferreira Nocelli

Coorientadora: Dr^a. Gleiciani
Bürger Patrício Roberto

ARARAS/SP
2026

Giroto, Marília Fernandes

Efeitos subletais do clorantraniliprole em *Bombus morio* (Swederus, 1787): análise de órgãos-alvo e não alvo / Marília Fernandes Giroto -- 2026. 103f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
Banca Examinadora: Matheus Mantuanelli Roberto, Caio Eduardo da Costa Domingues
Bibliografia

1. Abelha. 2. Agrotóxico. 3. Ecotoxicologia. I. Giroto, Marília Fernandes. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Curso de Mestrado da candidata Marília Fernandes Giroto, realizada em 23/02/2026.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (UFSCar)

Prof Dr Matheus Mantuanelli Roberto (UFSCar)

Dr. Caio Eduardo da Costa Domingues (UM)

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, em breve estarás fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Cassima e Valdir, à minha irmã Elena e à minha avó Zoraide, por todo o amor, apoio e dedicação à minha formação pessoal e acadêmica.

Ao meu namorado, Elivelton, pelo incentivo constante e pela participação ativa nas coletas em campo ao longo deste trabalho.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAs), pelo companheirismo, apoio e pelos momentos de descontração, que tornaram essa jornada mais leve e especial. A todos os pesquisadores que contribuíram de alguma forma para este trabalho, seja por meio de treinamentos, participação em bancas, conversas ou sugestões que enriqueceram minha pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Dr^a. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, e à minha coorientadora, Dr^a. Gleiciani Bürger Patrício Roberto, pela confiança, orientação e apoio ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar – Campus Araras), ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA), aos professores, servidores e colegas de turma, que contribuíram para minha formação e tornaram essa trajetória mais rica, acolhedora e inspiradora.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Da mesma maneira, à Capes pelo apoio financeiro desta pesquisa, bem como ao Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Projeto RTI - Difundindo e popularizando as atividades de ensino, pesquisa e extensão do CCA, Araras, SP, Brasil.

RESUMO GERAL

As abelhas nativas desempenham papel essencial nos serviços ecossistêmicos de polinização, mas ainda são pouco consideradas nas avaliações de risco de agrotóxicos. Nesse contexto, esta dissertação teve como objetivo investigar os efeitos subletais do clorotraniliprole por meio da exposição oral de operárias de *Bombus morio*, espécie nativa do Brasil, integrando revisão de literatura e experimentos laboratoriais. O primeiro capítulo consistiu em uma revisão sobre os efeitos de agrotóxicos em *Bombus*, com ênfase em mortalidade, comportamento e alterações morfofisiológicas, além da discussão sobre limitações dos protocolos toxicológicos. O segundo capítulo envolveu a adaptação de metodologias para bioensaios, incluindo sistemas de contenção e alimentação, bem como a avaliação da longevidade e da toxicidade em duas doses do inseticida. No terceiro capítulo, foram avaliados efeitos subletais por meio de análises comportamentais e histológicas do intestino médio, túbulos de Malpighi e musculatura de voo. Os resultados demonstraram que *B. morio* apresenta elevada tolerância ao confinamento, com longevidade média de 30 dias, e que o clorotraniliprole não provocou mortalidade estatisticamente significativa nas duas doses testadas. As análises comportamentais não indicaram alterações significativas entre os grupos. Em contrapartida, as análises histológicas evidenciaram alterações dose-dependentes nos três tecidos avaliados, incluindo desorganização tecidual, perda de material citoplasmático e alterações nucleares, sugerindo prejuízos em processos de digestão, absorção e excreção, além de possível comprometimento da função muscular associada à locomoção. De forma integrada, os resultados indicam que, embora não seja letal nem promova alterações comportamentais detectáveis no curto prazo, o clorotraniliprole induz alterações morfofisiológicas significativas em *B. morio*, reforçando a importância de considerar múltiplos *endpoints* subletais em análises ecotoxicológicas e de ampliar a inclusão de espécies nativas nos testes regulatórios.

Palavras-chave: Mamangava, inseticida, toxicidade, efeitos subletais, alterações histológicas.

GENERAL ABSTRACT

Native bees play an essential role in pollination ecosystem services, yet they are still underrepresented in pesticide risk assessments. In this context, this dissertation aimed to investigate the sublethal effects of chlorantraniliprole through oral exposure in workers of *Bombus morio*, a species native to Brazil, integrating a literature review and laboratory experiments. The first chapter consisted of a review on the effects of pesticides on *Bombus*, with emphasis on mortality, behavior, and morphophysiological alterations, as well as a discussion on the limitations of current toxicological protocols. The second chapter involved the adaptation of methodologies for bioassays, including containment and feeding systems, as well as the evaluation of longevity and toxicity at two doses of the insecticide. In the third chapter, sublethal effects were assessed through behavioral and histological analyses of the midgut, Malpighian tubules, and flight muscles. The results demonstrated that *B. morio* exhibits high tolerance to confinement, with a mean longevity of 30 days, and that chlorantraniliprole did not cause statistically significant mortality at the tested doses. Behavioral analyses did not reveal significant differences among groups. In contrast, histological analyses showed dose-dependent alterations in all three tissues evaluated, including tissue disorganization, loss of cytoplasmic material, and nuclear alterations, suggesting impairment in digestion, absorption, and excretion processes, as well as a possible compromise of muscle function associated with locomotion. Overall, the results indicate that, although not lethal and not inducing detectable behavioral changes in the short term, chlorantraniliprole can cause significant morphophysiological alterations in *B. morio*, highlighting the importance of considering multiple sublethal endpoints in ecotoxicological assessments and of expanding the inclusion of native species in regulatory testing.

Keywords: bumblebee, insecticide, toxicity, sublethal effects, histological alterations.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Fluxograma metodológico do processo de seleção dos estudos incluídos na revisão.....14

CAPÍTULO 2

Figura 1. Coleta ativa de *B. morio* no campus da UFSCar – Araras (SP) 43

Figura 2. Estufa tipo D.B.O utilizada para manutenção dos indivíduos em condições controladas durante os bioensaios laboratoriais.....44

Figura 3. Três modelos de potes plásticos transparentes testados para a contenção das abelhas.....46

Figura 4. Gaiola experimental utilizada para a contenção de *B. morio* durante os bioensaios.....47

Figura 5. Configurações dos cinco tipos de alimentadores testados em potes formato tronco de cone invertido de 1000 mL.....48

Figura 6. Operária *B. morio* consumindo xarope no sistema de alimentação desenvolvido nos bioensaios.....49

Figura 7. Taxa de sobrevivência de operárias de *B. morio* mantidas em condições laboratoriais controladas.....54

Figura 8. Mortalidade (%) de operárias de *B. morio* expostas a diferentes tratamentos.....55

CAPÍTULO 3

Figura 1. Organização epitelial e alterações histológicas no intestino médio de *B. morio* em resposta à exposição ao clorantraniliprole (D1 e D2).....81

Figura 2. Detalhes do intestino médio de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantraniliprole.....82

Figura 3. Alterações histológicas quantitativas no intestino médio de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantraniliprole em duas concentrações.....83

Figura 4. Fotomicrografias dos túbulos de Malpighi de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantraniliprole em duas concentrações.....86

Figura 5. Alterações histológicas quantitativas nos túbulos de Malpighi de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantraniliprole em duas concentrações.....87

Figura 6. Fotomicrografias da musculatura de voo de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantraniliprole em duas concentrações.....89

Figura 7. Parâmetros comportamentais avaliados em *B. morio* nos grupos controle, solvente e expostos ao clorantraniliprole em duas concentrações.....90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de elegibilidade e parâmetros de extração de dados utilizados na revisão..... 16

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

B.O.D. - Demanda Bioquímica de Oxigênio

CS - Controle Solvente

D1- Clorantraniliprole Dose 1

D2- Clorantraniliprole Dose 2

CN - Controle negativo

CP - Controle positivo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
CAPÍTULO 1.....	9
Efeitos dos agrotóxicos sobre espécies de abelhas do gênero <i>Bombus</i> : subsídios para a avaliação de risco para espécies brasileiras.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. METODOLOGIA.....	14
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
3.1 Efeitos na mortalidade.....	16
3.1.1 Inseticidas.....	17
3.1.2 Fungicidas.....	21
3.1.3 Herbicidas.....	22
3.2 Efeitos no comportamento.....	23
3.2.1 Inseticidas.....	24
3.2.2 Fungicidas.....	26
3.2.3 Herbicidas.....	27
3.3 Efeitos na Morfofisiologia.....	28
3.3.1 Inseticidas.....	30
3.3.2 Fungicidas.....	31
3.3.3 Herbicidas.....	32
4. CONCLUSÃO.....	33
5. REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 2.....	39
Impacto do clorantraniliprole em <i>Bombus morio</i> (Swederus, 1787): Adaptação de Protocolos de Manutenção Laboratorial e Avaliação de Mortalidade.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1 Material biológico.....	43
2.2 Transporte e manutenção dos indivíduos.....	44
2.3 Gaiola Experimental.....	45
2.4 Alimentadores.....	47
2.4 Teste de sobrevivência em condições controladas.....	49
2.5 Teste de toxicidade oral.....	50
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4. RESULTADOS.....	51
4.1 Gaiola Experimental.....	51
4.2 Alimentadores.....	52
4.3 Teste de sobrevivência em laboratório.....	53

4.4 Teste de toxicidade.....	54
4.5 Validação dos bioensaios.....	55
5. DISCUSSÃO.....	56
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	64
CAPÍTULO 3.....	69
Análise histológica e comportamental dos efeitos subletais do clorantraniliprole em <i>Bombus morio</i> (Swederus, 1787).....	69
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	75
2.1 Coleta e manutenção dos indivíduos.....	75
2.2 Exposição ao agrotóxico.....	75
2.3 Análise histológica.....	76
2.4. Análise comportamental.....	76
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
4. RESULTADOS.....	79
4.1 Intestino Médio.....	79
4.2 Túbulos de Malpighi.....	84
4.3 Músculo de voo.....	87
4.4. Análise comportamental.....	89
5. DISCUSSÃO.....	91
6. CONCLUSÃO.....	98
7. REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS.....	103
Anexo I.....	103

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os animais participam de inúmeras interações ecológicas, dentre elas a polinização, que garante a prosperidade reprodutiva da maior parte das plantas nativas e cultivadas, contribuindo também para a manutenção da diversidade genética das populações vegetais, para o equilíbrio ecológico dos ecossistemas e para a geração de benefícios econômicos associados à produção agrícola (Potts *et al.*, 2010; Ollerton; Winfree; Tarrant, 2011). O grupo mais significativo de polinizadores é representado pelos insetos (Schoonhoven; Jermy; Van-Loon, 1998), dentre os quais, as abelhas são as mais especializadas, com cerca de 20.000 espécies identificadas (IPBES, 2016). Elas apresentam adaptações morfológicas para coletar, manipular, transportar e armazenar o pólen de maneira eficaz, ainda que ele se apresente em uma diversidade de formas e tamanhos (Danforth *et al.*, 2006).

Considerando a polinização em áreas agrícolas, a taxa de reprodução cruzada aumenta em locais onde existem insetos polinizadores, elevando também a produtividade e a qualidade dos cultivos (Patrício-Roberto *et al.*, 2025). No Brasil, 141 espécies cultivadas dependem em algum grau da polinização por abelhas (Lagôa *et al.*, 2021). Ainda, 73% de todas as plantas do mundo são dependentes da polinização por este grupo (Patrício-Roberto; Campos, 2014). Diante disso, as abelhas desempenham um papel essencial não apenas para a manutenção da biodiversidade, mas também para a segurança alimentar e os serviços ecossistêmicos.

Dentre os diversos grupos de abelhas, o gênero *Bombus* destaca-se por sua alta eficiência na polinização de flores com morfologia complexa, pois realiza a polinização por vibração, também conhecida como *buzz pollination* (de Luca; Vallejo-Marín, 2013). Esse mecanismo consiste na vibração da musculatura torácica sobre as flores, liberando o pólen, e é essencial para espécies vegetais que dependem de estímulos mecânicos para sua liberação (Patrício-Roberto *et al.*, 2012). Apesar de sua relevância ecológica e econômica, o conhecimento sobre as espécies de *Bombus* presentes no Brasil ainda é limitado, especialmente quanto à sua resposta a estressores ambientais, como os agrotóxicos (Silva *et al.*, 2021; Cecchetto *et al.*, 2023).

Nas últimas décadas, as populações de abelhas têm diminuído significativamente em diversas regiões do mundo, o que preocupa pesquisadores e autoridades devido ao impacto direto sobre os serviços de polinização, essenciais para a produção de alimentos e a segurança alimentar global (Beringer; Maciel; Tramontina, 2019; Zattara; Aizen, 2021).

Dentre os principais fatores associados ao declínio de populações de abelhas estão as mudanças climáticas, patógenos, perda de habitat e, especialmente, o uso intensivo de agrotóxicos (IPBES, 2016). Esses compostos representam uma ameaça direta à saúde desses insetos, uma vez que podem contaminar o néctar, o pólen e outras partes florais, expondo as abelhas por ingestão ou por contato com superfícies contendo resíduos de agrotóxicos. Essa exposição pode afetar o comportamento, a fisiologia e a sobrevivência dos indivíduos (Nocelli *et al.*, 2018).

Entre os agrotóxicos mais utilizados atualmente está o clorantraniliprole (Dos Santos *et al.*, 2024), um inseticida da classe das diamidas antranílicas, amplamente aplicado em diversas culturas agrícolas, como tomate, pimentão e berinjela, as quais costumam atrair grande diversidade de polinizadores durante seus períodos de floração (BPBES, 2019; FMC, 2021). Esse composto atua sobre receptores de rianodina (RyR), promovendo a liberação desregulada de íons cálcio nas células musculares e nervosas, o que afeta diretamente processos fisiológicos essenciais nos insetos, como contração muscular, comunicação neural, secreção hormonal e divisão celular (Collet *et al.*, 2021), resultando em sintomas como paralisia, letargia, cessação alimentar e regurgitação (Córdova *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2021).

Embora tenha sido considerado um agrotóxico de risco reduzido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA, 2008) e frequentemente classificado como seletivo, há evidências de sua alta persistência ambiental (EFSA, 2013; Zhang *et al.*, 2025), o que pode prolongar a exposição de organismos não alvo mesmo após a aplicação. Diante desse cenário, torna-se urgente ampliar as investigações toxicológicas envolvendo polinizadores nativos, a fim de compreender melhor os riscos associados ao uso desse composto em diferentes ecossistemas.

Além da toxicidade, caracterizada pela morte dos indivíduos, os efeitos subletais dos agrotóxicos também merecem atenção. Mesmo em doses menores, incluindo aquelas recomendadas nas bulas dos produtos formulados, essas substâncias podem induzir alterações comportamentais, morfológicas e fisiológicas, danos celulares e redução da longevidade em abelhas (Nocelli *et al.*, 2018; Syromyatnikov, 2020). Esses efeitos, embora não letais, podem comprometer significativamente o desempenho e a sobrevivência das abelhas (Nocelli *et al.*, 2018).

Diante da importância das abelhas nativas para a conservação da biodiversidade, torna-se fundamental investigar os impactos dos agrotóxicos sobre espécies pouco estudadas, como as do gênero *Bombus*. O gênero *Bombus* apresenta ampla distribuição global, com aproximadamente 250 espécies descritas, sendo a maior diversidade encontrada em regiões

temperadas do hemisfério norte (Michener, 2007). No Brasil, entretanto, a riqueza de espécies é significativamente menor, com cerca de sete espécies registradas no país (Françoso, Oliveira e Arias, 2016).

Apesar de sua relevância ecológica como polinizadores eficientes, a maioria dos estudos toxicológicos concentra-se na espécie *Apis mellifera* (Williams; Swale; Anderson, 2020; Haas *et al.*, 2021). No entanto, diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais entre as espécies de abelhas podem resultar em respostas distintas à exposição aos agrotóxicos (Oga, Camargo, Batistuzzo, 2008; Loureccetti *et al.*, 2023).

Nesse contexto, a maior parte dos estudos envolvendo abelhas do gênero *Bombus* concentra-se em espécies do hemisfério norte (Goulson, 2010; IPBES, 2016). Para as espécies brasileiras, entretanto, as avaliações ecotoxicológicas ainda são limitadas (Silva *et al.*, 2021; Cecchetto *et al.*, 2023), evidenciando a necessidade de ampliar as pesquisas com espécies nativas para uma compreensão mais abrangente dos efeitos dos agrotóxicos.

Nesse contexto, a hipótese geral deste trabalho é que a exposição ao inseticida clorantraniliprole, mesmo em níveis subletais, compromete estruturas e funções essenciais à sobrevivência e ao desempenho das abelhas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar os possíveis efeitos do agrotóxico clorantraniliprole sobre abelhas *Bombus morio* (Swederus, 1787) submetidas à exposição oral, com ênfase nos efeitos subletais em níveis comportamental, morfológico e fisiológico.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do capítulo 1 deste estudo foram:

- Revisar estudos que avaliam os efeitos de agrotóxicos sobre abelhas do gênero *Bombus*, com ênfase em mortalidade, efeitos comportamentais e alterações morfofisiológicas.
- Discutir as limitações de protocolos toxicológicos atualmente utilizados e sua adequação para a avaliação de risco em espécies nativas.

Os objetivos específicos do capítulo 2 deste estudo foram:

- Padronizar um sistema de contenção individual para operárias de *B. morio*, por meio do desenvolvimento de gaiolas experimentais adequadas à manutenção e exposição dos indivíduos.
- Desenvolver e validar um modelo de alimentador seguro e eficiente para o fornecimento de alimento líquido em bioensaios laboratoriais com *B. morio*.
- Avaliar a taxa de sobrevivência de operárias de *B. morio* mantidas em condições laboratoriais controladas, a fim de estabelecer valores de referência da longevidade da espécie em ambiente artificial.
- Investigar os efeitos do inseticida clorantraniliprole sobre operárias adultas de *B. morio*, por meio da exposição oral a diferentes concentrações do ingrediente ativo.

Os objetivos específicos do capítulo 3 deste estudo foram:

- Avaliar alterações comportamentais em operárias de *B. morio* expostas oralmente ao clorantraniliprole, considerando possíveis mudanças associadas a efeitos subletais do agrotóxico.
- Analisar possíveis alterações morfológicas (intestino médio, túbulos de Malpighi e musculatura de voo) de operárias de *B. morio* expostas oralmente ao clorantraniliprole.
- Avaliar e comparar a integridade histológica desses tecidos entre os diferentes grupos experimentais, a fim de identificar possíveis efeitos subletais decorrentes da exposição ao agrotóxico.

Ainda, os dados obtidos com pesquisas dessa natureza podem contribuir com o cumprimento de alguns Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos pela ONU e parte integrante da Agenda 2030 (UNITED NATIONS, 2015). O presente projeto atende diretamente ao ODS nº 15 – “Vida terrestre” e, de forma indireta, aos ODS nº 2 – “Fome zero e agricultura sustentável”, nº 12 – “Consumo e produção responsáveis” e nº 13 – “Ação contra a mudança global do clima” (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2015).

3. ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS

A presente dissertação está estruturada em três capítulos, sendo um capítulo de revisão de literatura e dois capítulos experimentais, que exploram diferentes abordagens metodológicas para a avaliação dos efeitos do agrotóxico clorantraniliprole sobre operárias da espécie *B. morio*.

O capítulo 1 consiste em uma revisão da literatura sobre os riscos dos agrotóxicos para abelhas do gênero *Bombus*, com foco em mortalidade, efeitos comportamentais e alterações morfofisiológicas. Nesta seção, são discutidos estudos realizados com diferentes classes de agrotóxicos, bem como as limitações dos protocolos toxicológicos atualmente disponíveis, especialmente no contexto das espécies nativas brasileiras.

O capítulo 2 aborda o desenvolvimento e a padronização de um sistema experimental para ensaios com *B. morio* em condições controladas de laboratório. São apresentados os procedimentos de coleta, transporte, manutenção e alimentação dos indivíduos, bem como a construção de gaiolas experimentais e alimentadores adaptados. Além disso, este capítulo inclui os resultados do teste de sobrevivência em condições laboratoriais e da avaliação da mortalidade de operárias expostas oralmente ao clorantraniliprole durante um período de 48 horas.

Os bioensaios foram adaptados a partir da diretriz OECD nº 247 (2017), originalmente desenvolvida para a determinação de DL_{50} (Dose Letal Mediana) em *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) e *Bombus impatiens* (Cresson, 1863), uma vez que não existe um protocolo para uma espécie brasileira.

O capítulo 3 investiga os possíveis efeitos subletais do clorantraniliprole em *B. morio*, utilizando as mesmas doses e o mesmo período de exposição adotados no segundo capítulo. A abordagem empregada consistiu na avaliação de alterações comportamentais, além da análise histológica de intestino médio, túbulos de Malpighi e musculatura de voo. Para isso, foram aplicados protocolos de inclusão em historesina e coloração com hematoxilina e eosina, com o objetivo de detectar alterações morfológicas nos tecidos analisados. As seções histológicas obtidas permitiram a comparação entre os diferentes grupos experimentais e contribuíram para uma compreensão mais profunda dos danos celulares que podem ocorrer em concentrações consideradas subletais do agrotóxico, em associação às respostas comportamentais avaliadas.

4. REFERÊNCIAS

BERINGER, J.; MACIEL, F. L.; TRAMONTINA, F. O. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 5, n. 1, p. 18–27, 2019.

PLATAFORMA BRASILEIRA DE BIODIVERSIDADE E SERVIÇOS ECOSISTÊMICOS (BPBES). **Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil**. 1. ed. São Carlos: Editora Cubo, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>. Acesso em: 23 jun. 2025.

CECCHETTO, F. *et al.* Occurrence of chlorpyrifos and organochlorine pesticides in a native bumblebee (*Bombus pauloensis*) living under different land uses in the southeastern Pampas, Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 905, p. 167117, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167117>.

COLLET, C. *et al.* Elementary calcium release events in the skeletal muscle cells of the honey bee *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 11, art. 16867, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96028-w>.

CÓRDOVA, D. *et al.* Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, p. 196–214, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>.

DANFORTH, B. N. *et al.* The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 41, p. 15118–15123, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0604033103>.

DE LUCA, P. A.; VALLEJO-MARÍN, M. What's the 'buzz' about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 4, p. 429–35, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.05.002>. Acesso em: 1 abr. 2026.

SANTOS, Y. B. DOS *et al.* Inseticidas de diamida e seus efeitos sobre mamíferos. **Ciências Biológicas e da Saúde: integrando saberes em diferentes contextos**, v. 7, n. 1, p. 148–159, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.37885/240717181>.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorantraniliprole. **EFSA Journal**, v. 11, n. 6, p. 1–107, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3143>.

FMC QUÍMICA DO BRASIL. **Grânulos dispersíveis em água (WG)**: [bula]. Campinas: FMC Química do Brasil Ltda., 2021. Disponível em: <https://fmcagricola.com.br/Content/Fotos/Bula%20-%20Altacor.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2025.

FRANÇOSO, E.; OLIVEIRA, F. F. de; ARIAS, M. C. An integrative approach identifies a new species of bumblebee (Hymenoptera: Apidae: Bombini) from northeastern Brazil. **Apidologie**, v. 47, p. 171–185, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0385-7>.

GOULSON, D. **Bumblebees: behaviour, ecology and conservation**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2010.

HAAS, J. *et al.* A mechanism-based approach unveils metabolic routes potentially mediating chlorantraniliprole synergism in honey bees, *Apis mellifera* L., by azole fungicides. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, p. 965–973, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.6706>.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES (IPBES). **The assessment report on pollinators, pollination and food production**. Bonn: IPBES Secretariat, 2016. Disponível em: https://ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/2017_pollination_full_report_book_v12_pages.pdf. Acesso em: 23 jun. 2025.

LAGÔA, A. C. G. *et al.* **Atlas dos insetos: fatos e dados sobre as espécies mais numerosas da Terra**. Rio de Janeiro: Fundação Heinrich Böll, 2021. Disponível em: <https://br.boell.org/sites/default/files/2022-02/Atlas%20dos%20Insetos%20completa%20final.pdf>. Acesso em: 23 out. 2023.

LOURENCETTI, A. P. S. *et al.* Surrogate species in pesticide risk assessments: toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, art. 120842, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120842>. Acesso em: 30 jun. 2025.

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

NOCELLI, R. C. F. *et al.* **Riscos de pesticidas sobre as abelhas**. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2025.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321–326, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>. Acesso em: 20 abr. 2026.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **Transformando nosso mundo: a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável**. [S. l.]: ONU, 2015. Disponível em: <https://sdgs.un.org/goals>. Acesso em: 30 jul. 2025.

POTTS, S. G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>. Acesso em: 20 abr. 2026.

PATRÍCIO-ROBERTO, G. B.; CAMPOS, M. J. O. Aspects of landscape and pollinators: what is important to bee conservation? **Diversity**, v. 6, n. 1, p. 158–175, 2014.

PATRÍCIO-ROBERTO, G. B. *et al.* The importance of bees for eggplant cultivations (Hymenoptera: Apidae, Andrenidae, Halictidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 3, 2012.

PATRÍCIO-ROBERTO, G. B. *et al.* Evaluating the significance of native vegetation surrounding orange orchards for the pollinator community. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 393, art. 109830, 2025. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880925001352>. Acesso em: 1 abr. 2026.

SCHOONHOVEN, L. M.; JERMY, T.; VAN-LOON, J. J. A. (org.). **Insect-plant biology: from physiology to evolution**. London: Chapman & Hall, 1998.

SILVA, J. G. *et al.* Determinação de resíduos de agrotóxicos em *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae) empregando o método Quechers modificado e LC-MS/MS e GCMS/MS. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 12, n. 6, p. 535–546, 2021. Disponível em: <http://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.006.0044>.

SYROMYATNIKOV, M. Y. *et al.* Pesticides effect on the level of mtDNA damage in bumblebees heads (*Bombus terrestris* L.). **Periódico Tchê Química**, v. 17, n. 34, p. 395–402, 2020.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test no. 247: Bumblebee, acute oral toxicity test**. Paris: OECD, 2017. Disponível em: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-no-247-bumblebee-acute-oral-toxicity-test-9789264284128-en.htm>. Acesso em: 11 out. 2023.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA). **Pesticide fact sheet: chlorantraniliprole**. Washington, DC: EPA, 2008. Disponível em: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-090100_01-Apr-08.pdf. Acesso em: 30 jun. 2025.

WILLIAMS, J. R.; SWALE, D. R.; ANDERSON, T. D. Comparative effects of technical-grade and formulated chlorantraniliprole to the survivorship and locomotor activity of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2582–2588, 2020.

ZATTARA, E. E.; AIZEN, M. A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. **One Earth**, v. 4, n. 1, p. 114–123, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>. Acesso em: 20 abr. 2026.

ZHANG, X. *et al.* The fate and ecological risk of typical diamide insecticides in soil ecosystems under repeated application. **Journal of Hazardous Materials**, v. 494, art. 138440, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2025.138440>. Acesso em: 20 abr. 2026.

CAPÍTULO 1

Efeitos dos agrotóxicos sobre espécies de abelhas do gênero *Bombus*: subsídios para a avaliação de risco para espécies brasileiras.

RESUMO

A avaliação dos impactos de agrotóxicos sobre abelhas do gênero *Bombus* tem se baseado principalmente em testes de mortalidade, embora esse enfoque isolado apresente limitações para a compreensão dos riscos ecológicos em condições reais de uso agrícola. Neste capítulo, foi realizada uma análise integrativa dos efeitos de inseticidas, fungicidas e herbicidas sobre *Bombus*, considerando mortalidade, comportamento e alterações morfofisiológicas. A análise foi conduzida por meio de buscas sistemáticas nas bases Web of Science, Scopus, PubMed e ScienceDirect, utilizando os descritores “*Bombus*”, “bumblebee”, “toxicology”, “pesticide” e “mortality”. Os estudos foram selecionados em quatro etapas sequenciais (identificação, triagem, elegibilidade e fichamento), sendo incluídos apenas artigos empíricos publicados entre 2016 e 2025 que apresentassem descrição metodológica detalhada e informações suficientes para a extração de dados como ingrediente ativo, via de exposição, dose, estágio de vida e desfechos avaliados. Artigos de revisão foram utilizados apenas para contextualização teórica, sem inclusão na análise comparativa dos resultados. A análise comparativa permitiu identificar padrões de resposta entre classes de produtos e níveis de organização biológica. Os resultados indicam que inseticidas, especialmente neonicotinoides, concentram a maior parte dos efeitos letais agudos, embora a magnitude da mortalidade varie conforme o ingrediente ativo, a dose e a duração da exposição. Fungicidas e herbicidas, por sua vez, raramente provocam mortalidade direta, mas aparecem associados a efeitos subletais relevantes, sobretudo em contextos de exposição contínua ou combinada. Alterações comportamentais ocorreram predominantemente em concentrações subletais, afetando funções essenciais como forrageamento, aprendizagem, organização social e reprodução. No nível morfofisiológico, foram descritas alterações em tecidos neurais, musculares e reprodutivos, frequentemente ausentes em avaliações baseadas apenas em sobrevivência. Dessa forma, os dados reforçam que protocolos focados exclusivamente em mortalidade aguda de operárias têm alcance limitado para estimar o risco real em cenários agrícolas. Abordagens que integrem diferentes resultados, regimes de exposição prolongados, misturas de produtos e estágios sensíveis do ciclo de vida oferecem uma base mais robusta para a avaliação dos impactos de agrotóxicos sobre *Bombus*.

Palavras-chave: Mortalidade, efeitos subletais, exposição crônica, toxicidade.

ABSTRACT

The assessment of pesticide impacts on bees of the genus *Bombus* has been primarily based on mortality tests, although this isolated approach presents limitations for understanding ecological risks under realistic agricultural conditions. In this chapter, an integrative analysis was conducted on the effects of insecticides, fungicides, and herbicides on *Bombus*, considering mortality, behavior, and morphophysiological alterations. The analysis was carried out through systematic searches in the Web of Science, Scopus, PubMed, and ScienceDirect databases, using the descriptors “*Bombus*”, “bumblebee”, “toxicology”, “pesticide”, and “mortality”. Studies were selected through four sequential stages (identification, screening, eligibility, and data extraction), including only empirical articles published between 2016 and 2025 that provided detailed methodological descriptions and sufficient information for data extraction, such as active ingredient, exposure route, dose, life stage, and evaluated endpoints. Review articles were used solely for theoretical contextualization and were not included in the comparative analysis. The comparative analysis allowed the identification of response patterns across pesticide classes and levels of biological organization. The results indicate that insecticides, particularly neonicotinoids, account for most acute lethal effects, although mortality levels vary according to the active ingredient, dose, and exposure duration. Fungicides and herbicides, in contrast, rarely cause direct mortality but are associated with relevant sublethal effects, especially under continuous or combined exposure scenarios. Behavioral alterations were predominantly observed at sublethal concentrations, affecting essential functions such as foraging, learning, social organization, and reproduction. At the morphophysiological level, alterations were reported in neural, muscular, and reproductive tissues, often undetected in assessments based solely on survival. Overall, these findings demonstrate that protocols focused exclusively on acute worker mortality have limited capacity to estimate real risk under agricultural conditions. Approaches integrating multiple endpoints, prolonged exposure regimes, pesticide mixtures, and sensitive life stages provide a more robust framework for assessing pesticide impacts on *Bombus*.

Keywords: Mortality; sublethal effects; chronic exposure; toxicity.

1. INTRODUÇÃO

A polinização constitui um serviço ecossistêmico regulador e de manutenção, sendo crucial para a conservação da biodiversidade e um dos pilares da segurança alimentar em nível global (Klein *et al.*, 2007; Potschin e Haines-Young, 2011). O processo de polinização pode ocorrer por meios abióticos, como vento ou água; ou bióticos, como ocorre na maioria das plantas, em que as abelhas se destacam como os polinizadores mais especializados (Roubik, 2018; BPBES; REBIPP, 2019), apresentando uma longa história de coadaptação com diferentes grupos vegetais (Martins, 2013).

Algumas espécies de plantas silvestres e cultivadas apresentam características biológicas específicas, como anteras poricidas, que requerem um comportamento especializado para a liberação do pólen (de Luca; Vallejo-Marín, 2013). Esse comportamento, conhecido como polinização por vibração (*buzz pollination*), é realizado por um grupo específico de abelhas capazes de vibrar os músculos torácicos durante o forrageamento, promovendo a sonicação das anteras e a consequente liberação do pólen, desempenhando um papel essencial na polinização dessas plantas (Patrício-Roberto *et al.*, 2012; BPBES; REBIPP, 2019).

O gênero *Bombus* apresenta ampla distribuição global, com aproximadamente 250 espécies descritas, sendo a maior diversidade registrada em regiões temperadas do hemisfério norte, enquanto no Brasil são reconhecidas cerca de sete espécies nativas (Michener, 2007; Françoso; Oliveira; Arias, 2016). Entre as espécies vibradoras, as abelhas do gênero *Bombus*, são capazes de forragear sob condições climáticas subtóxicas, o que amplia sua eficiência como polinizadores (Bie *et al.*, 2025). A importância desse gênero para a polinização de culturas agrícolas vem sendo documentada desde o início do século XX em diferentes regiões do mundo (Plath, 1925; Dafni *et al.*, 2010; Patrício-Roberto *et al.*, 2012; Oliveira, 2014; Abrol, Mondal e Shankar, 2021; Nery; Palottini; Farina, 2024). Em nível global, especialmente em países do hemisfério norte, a partir da década de 1980, o uso de colônias manejadas de mamangavas para polinização assistida passou a se expandir globalmente, especialmente na Europa, em razão dos expressivos ganhos de produtividade observados tanto em cultivos a céu aberto quanto em ambientes protegidos (Oliveira, 2014; Abrol, Mondal e Shankar, 2021; Barda *et al.*, 2024).

No Brasil, espécies nativas de *Bombus* atuam na polinização de plantas silvestres e de culturas de importância econômica, especialmente da família Solanaceae, como tomate, berinjela, pimentão, entre outras (BPBES; REBIPP, 2019). Apesar de sua elevada relevância

ecológica e econômica, a polinização no país depende majoritariamente de espécies silvestres, e ainda há uma expressiva lacuna de conhecimento acerca da biologia e da ecologia das espécies brasileiras de *Bombus*. Essa lacuna está relacionada, sobretudo, à dificuldade de localizar ninhos em ambiente natural, bem como ao comportamento defensivo dessas espécies quando comparadas às espécies do gênero *Bombus* amplamente utilizadas em sistemas de polinização manejada (Oliveira *et al.*, 2022).

A introdução de colônias manejadas de espécies exóticas de *Bombus* é legalmente restrita no Brasil, dependendo de autorização e parecer técnico dos órgãos ambientais competentes, conforme previsto na legislação ambiental brasileira (Lei nº 9.605/1998), em razão de suas potenciais implicações ecológicas (BRASIL, 1998; Oliveira, 2014). *B. terrestris*, a espécie mais comercializada no mundo entre as mamangavas, apresenta elevada capacidade de dispersão e competição, características associadas ao comportamento invasor, representando, assim, uma ameaça aos ecossistemas locais (Dafni *et al.*, 2010).

Atualmente, diferentes empresas, principalmente europeias, comercializam e exportam colônias de *Bombus* sp. para diversas regiões do mundo (Oliveira, 2014). Contudo, a importação de abelhas não-nativas representa riscos expressivos para a diversidade local, incluindo competição por recursos alimentares, disputa por locais de nidificação e transmissão de patógenos exóticos (Saraiva *et al.*, 2012; Oliveira, 2014).

Os riscos associados à introdução de abelhas exóticas em território brasileiro são amplamente reconhecidos, especialmente a partir do histórico da subespécie *Apis mellifera scutellata*, que, após sua introdução miscigenou com as subespécies europeias introduzidas anteriormente, gerando um híbrido que expandiu-se rapidamente até o sul dos Estados Unidos (Schmid-Hempel *et al.*, 2007).

Em meados dos anos 1990, o Brasil intensificou o uso do cultivo protegido em casas de vegetação, abrindo um cenário potencialmente favorável à adoção da polinização assistida com mamangavas (Oliveira, 2014). Contudo, apesar de proibir a introdução de espécies exóticas de *Bombus*, o país não dispõe de colônias manejadas de espécies nativas, o que limita o aproveitamento desse serviço ecossistêmico na agricultura nacional, apesar de seu reconhecido potencial para a melhoria da qualidade e da produtividade dos alimentos (Oliveira, 2014; Klein *et al.*, 2020). Dentre os alimentos que poderiam ser beneficiados pelo uso dessas colônias, destacam-se: berinjela, maracujá-amarelo, mirtilo e morango (Velthuis; Doorn, 2006; Oliveira, 2014; Giannini *et al.*, 2015; BPBES; REBIPP, 2019).

No Brasil, a utilização de colônias manejadas de *Bombus* é limitada não apenas pelos riscos ecológicos associados à introdução de espécies exóticas. O cenário agrícola nacional,

marcado pelo elevado uso de agrotóxicos em diferentes culturas (Spadotto; Gomes, 2021), também constitui um fator que dificulta o manejo dessas abelhas. Grande parte desses produtos é aplicada em cultivos que apresentam intensa oferta de recursos florais atrativos para polinizadores (Brasil, 2019), o que eleva a probabilidade de exposição a resíduos presentes no néctar, no pólen e até na água consumida durante o forrageamento (BPBES; REBIPP, 2019). Esse cenário torna complexo o manejo seguro de *Bombus* sp., uma vez que a exposição contínua ou repetida aos agrotóxicos pode comprometer o comportamento, a fisiologia e a sobrevivência dos indivíduos (Nocelli *et al.*, 2018).

Nesse contexto, de acordo com o sistema AGROFIT do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), uma ampla diversidade de ingredientes ativos utilizados no país é registrada para aplicação em múltiplas culturas agrícolas. Essa sobreposição de uso amplia a probabilidade de exposição de *Bombus* sp. a diferentes classes de agrotóxicos durante o forrageamento, geralmente em cenários de uso repetido e combinado, reforçando a relevância de avaliações que considerem condições mais próximas da realidade agrícola brasileira.

Apesar da crescente preocupação com os impactos dos agrotóxicos sobre a fauna nativa, ainda não existem protocolos padronizados específicos para a avaliação toxicológica de espécies brasileiras de *Bombus*. Atualmente, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) disponibiliza diretrizes específicas para testes com abelhas desse gênero; entretanto, tais normas foram desenvolvidas para *B. terrestris* e *B. impatiens* (OECD, 2017). No contexto regulatório nacional, a avaliação de risco ambiental de agrotóxicos é conduzida com base em protocolos que utilizam *A. mellifera* como organismo teste representativo das abelhas, conforme estabelecido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2017), evidenciando a ausência de protocolos padronizados voltados às espécies nativas.

Diante desse cenário, considerando a importância das espécies nativas do gênero *Bombus* para a manutenção de plantas nativas, bem como para a produção agrícola, tanto para o consumo interno quanto para exportação, o objetivo desta revisão é analisar os efeitos de agrotóxicos sobre abelhas do gênero *Bombus*, considerando resultados relacionados à mortalidade, alterações comportamentais e efeitos morfofisiológicos descritos na literatura. Foram incluídos estudos conduzidos com espécies não nativas, devido à escassez de pesquisas envolvendo espécies brasileiras, com o intuito de discutir possíveis implicações para as espécies que ocorrem naturalmente em áreas agrícolas no Brasil.

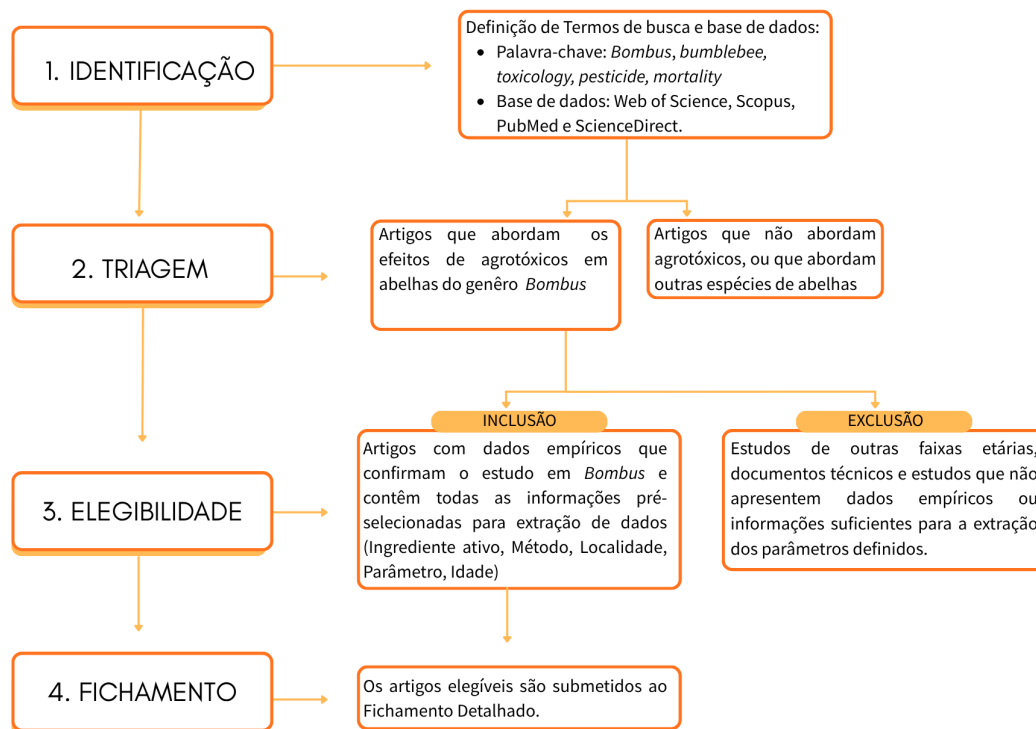
2. METODOLOGIA

A busca pela literatura científica foi realizada com o objetivo de identificar pesquisas que avaliassem os efeitos de agrotóxicos para abelhas do gênero *Bombus*. A estratégia metodológica adotada foi baseada no procedimento descrito por Jennifer H. Olker *et al.* (2022). A pesquisa foi conduzida em bases de dados científicas e plataformas de indexação relevantes, incluindo Web of Science, Scopus, PubMed e ScienceDirect.

Com o intuito de concentrar a análise em evidências recentes e metodologicamente comparáveis, foram incluídos apenas artigos publicados no período de 2016 a 2025. A estratégia de busca foi otimizada por meio da combinação dos seguintes descritores em língua inglesa: “*Bombus*”, “*bumblebee*”, “*toxicology*”, “*pesticide*” e “*mortality*”.

O processo de seleção dos estudos seguiu quatro etapas sequenciais, conforme apresentado no Fluxograma Metodológico (Figura 1). Na primeira etapa, identificação, foram definidos os termos de busca e executadas as pesquisas nas bases selecionadas, resultando em um conjunto inicial de registros, os quais foram posteriormente submetidos às etapas de triagem, elegibilidade e fichamento.

Figura 1. Fluxograma metodológico do processo de seleção dos estudos incluídos na revisão.



Fonte: Autoria própria, 2025.

Na segunda etapa, triagem, os artigos foram avaliados com base na leitura dos títulos e resumos. Nessa fase, foram incluídas apenas publicações que abordassem explicitamente os efeitos de agrotóxicos em abelhas do gênero *Bombus*, sendo excluídos estudos realizados com outros grupos de abelhas ou que não apresentassem relação direta com o tema proposto.

A terceira etapa, elegibilidade, consistiu na leitura dos artigos pré-selecionados. Foram considerados elegíveis apenas estudos que apresentassem dados empíricos e informações metodológicas suficientes para a extração sistemática dos dados. Artigos de revisão, capítulos de livro, documentos técnicos e estudos que não descrevessem claramente o método experimental foram excluídos da análise principal, sendo utilizados exclusivamente como suporte teórico para contextualização e discussão conceitual ao longo do texto. Além disso, com base nos objetivos da presente revisão, foram priorizados estudos conduzidos com abelhas adultas do gênero *Bombus*. Trabalhos focados exclusivamente em estágios imaturos (larvas ou pupas) ou que não permitissem a distinção clara do estágio de vida avaliado não foram considerados para a análise dos efeitos toxicológicos.

Por fim, na etapa de fichamento, foram selecionados 35 estudos, os quais foram submetidos à extração padronizada das informações. Para cada artigo elegível, foram coletados dados referentes à espécie avaliada, classe do agrotóxico, ingrediente ativo, via e regime de exposição, tipo de efeito analisado (mortalidade, comportamento e/ou morfofisiologia) e principais resultados observados.

Os critérios de elegibilidade adotados, bem como os parâmetros analisados e os dados extraídos de cada estudo, estão descritos de forma detalhada na Tabela 1.

Após a etapa de fichamento, os estudos incluídos na presente revisão foram organizados de acordo com o tipo de efeito avaliado (mortalidade, comportamento e morfofisiologia), seguido pela classe do produto e, quando aplicável, pelo ingrediente ativo. Artigos de revisão utilizados ao longo do texto tiveram função exclusivamente contextual e não integraram a análise quantitativa dos resultados (ANEXO I).

Tabela 1. Critérios de elegibilidade e parâmetros de extração de dados utilizados na revisão.

Categoria	Critério de Seleção	Dados Extraídos
População/organismo	Estudo em espécies exclusivamente do gênero <i>Bombus</i> , na fase adulta	1. Espécie: Nome científico da espécie (<i>Bombus</i> sp.) 2. Idade: Adulto
Exposição/Agente Químico	Exposição a Agrotóxicos (ingrediente ativo ou produto formulado)	3. I.A. / Produto Formulado: Nome do ingrediente ativo ou do produto comercial 4. Mecanismo de Ação: Categoria do Agrotóxico
Método de Exposição	Estudo com metodologia detalhada que especifica o modo de aplicação e o contexto do estudo	5. Método= Via: Oral ou Tópico; Duração: Agudo ou Crônico; Ambiente: Laboratório ou campo.
Parâmetro	Avaliação de um Parâmetro Biológico mensurável (mortalidade, comportamento, fisiológico, etc)	6. Parâmetro Avaliado: Desfecho biológico medido (ex: DL50, taxa de forrageamento, sobrevivência da colônia)
Contexto	Avaliação de um Parâmetro Biológico mensurável (mortalidade, comportamento, fisiológico, etc.)	7. Localidade: País ou região onde o estudo foi realizado. 8. Autorizado/Cultura: Se o agrotóxico é autorizado no Brasil e em qual cultura
Publicação	Artigo em texto completo (excluídos artigos de revisão e documentos técnicos sem dados empíricos)	-----

Fonte: Autoria própria, 2025.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeitos na mortalidade

A mortalidade é um dos parâmetros mais utilizados em avaliações toxicológicas com abelhas, sendo amplamente empregada em estudos ecotoxicológicos por sua aplicação direta na avaliação de risco de agrotóxicos. De modo geral, esse parâmetro permite identificar efeitos letais decorrentes da exposição a diferentes classes de produtos, sendo frequentemente utilizado em testes padronizados e estudos comparativos. No entanto, embora a mortalidade seja um indicador fundamental para a tomada de decisão por órgãos reguladores, sua avaliação isolada apresenta limitações para a compreensão de impactos ecológicos mais amplos (Mommaerts; Smagghe, 2011; Dennis; Gibbs, 2025).

Dos 31 artigos selecionados nesta revisão, 23 artigos abordaram efeitos relacionados à mortalidade em abelhas do gênero *Bombus*. Desses, dois apresentaram a mortalidade como

único resultado avaliado, enquanto 21 também investigaram parâmetros comportamentais e/ou morfofisiológicos.

Nesse contexto, é relevante a distinção entre efeitos agudos e crônicos, uma vez que exposições de curta duração podem resultar em mortalidade imediata, enquanto exposições prolongadas, mesmo em concentrações ambientalmente realistas, podem não causar morte direta, mas desencadear efeitos cumulativos ao longo do tempo (Spurgeon *et al.*, 2016). Além disso, Belsky e Joshi (2020) observaram que a resposta à exposição varia de acordo com a classe do produto e o seu modo de ação, bem como com as condições experimentais e biológicas avaliadas.

Inseticidas neurotóxicos, como os neonicotinoides imidacloprido e tiametoxam, bem como o butenolídeo flupiradifurona, têm sido associados a elevados índices de mortalidade de abelhas, sobretudo após exposição oral, em função de sua ação sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina (Tasei; Lerin; Ripault, 2000; Mundy-Heisz; Prosser; Raine, 2022; Jie *et al.*, 2025). Em contraste, fungicidas amplamente utilizados na agricultura, como azoxistrobina, boscalida e propiconazol, assim como herbicidas à base de glifosato, tendem a apresentar baixa letalidade quando avaliados isoladamente, mesmo em condições de exposição crônica (Gradish *et al.*, 2009; Belsky; Joshi, 2020; Kaakinen *et al.*, 2024).

Contudo, a ausência de mortalidade direta não implica ausência de risco, uma vez que fungicidas capazes de interferir nos mecanismos de detoxificação das abelhas podem potencializar a toxicidade de inseticidas quando administrados em combinação, resultando em efeitos letais que não seriam observados na exposição isolada (Spurgeon *et al.*, 2016; Belsky; Joshi, 2020).

Sob essa perspectiva, abordagens integrativas, que considerem múltiplos níveis de organização biológica, têm sido apontadas como essenciais para uma compreensão mais abrangente dos impactos dos agrotóxicos sobre as abelhas, incluindo espécies do gênero *Bombus* (Camp; Lehmann, 2021).

3.1.1 Inseticidas

Nesta revisão, entre os 23 artigos que abordaram mortalidade em *Bombus* sp., 22 concentraram-se em inseticidas. Desses estudos, dois avaliaram exclusivamente mortalidade, enquanto os demais também investigaram efeitos subletais associados (ANEXO I).

Os inseticidas neonicotinoides constituem a classe mais frequentemente abordada nos estudos que avaliam mortalidade em abelhas do gênero *Bombus*, refletindo tanto sua ampla

utilização agrícola quanto a recorrente preocupação com seus efeitos sobre organismos não alvo. De modo geral, esses compostos, que atuam como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina, têm sido associados a efeitos letais principalmente em exposições agudas conduzidas em condições laboratoriais controladas. Ingredientes ativos como imidacloprido, tiametoxam e clotianidina podem induzir mortalidade significativa em espécies de *Bombus*, embora a magnitude desse efeito varie em função da dose, da via de exposição, do ingrediente ativo específico e da espécie avaliada (Marletto; Patetta; Manino, 2003; Reid *et al.*, 2020).

Ainda, a sensibilidade de *Bombus* sp. à exposição oral a inseticidas sistêmicos, tais quais imidacloprido, tiametoxam e clotianidina, pode diferir daquela observada em *A. mellifera*, o que evidencia limitações na extrapolação de dados entre espécies para avaliações de risco (Mundy-Heisz; Prosser; Raine, 2022). Dennis e Gibbs (2025) reforçam que apesar da ocorrência de mortalidade em determinados cenários experimentais, os efeitos observados para essa classe são heterogêneos e fortemente dependentes do contexto de exposição.

Outro fator importante está relacionado à variabilidade interespecífica observada dentro do gênero *Bombus*, diferenças fisiológicas e comportamentais entre espécies influenciam a absorção, a metabolização e a eliminação dos compostos, resultando em respostas distintas à exposição aos neonicotinoides (Reid *et al.*, 2020; Mundy-Heisz; Prosser; Raine, 2022). Esses resultados corroboram a inviabilidade de extrapolações diretas entre espécies de abelhas, especialmente quando dados obtidos com *A. mellifera* são utilizados como referência para a avaliação de risco de *Bombus* sp.

Apesar da recorrência de efeitos letais em exposições agudas, a resposta de *Bombus* sp. aos inseticidas neonicotinoides não é homogênea dentro dessa classe. Marletto, Patetta, Manino (2003) e Reid *et al.* (2020) demonstraram ampla variação na toxicidade entre ingredientes ativos, com diferenças expressivas nos valores de DL₅₀ e nos padrões de mortalidade observados entre compostos estruturalmente relacionados, como imidacloprido, tiametoxam e clotianidina. Essa heterogeneidade indica que generalizações baseadas apenas na classe química podem mascarar riscos específicos associados a determinados ingredientes ativos, especialmente quando avaliados sob condições laboratoriais padronizadas.

Estudos que avaliaram inseticidas de classes distintas à dos neonicotinoides, como o clorantraniliprole, também evidenciam as limitações de interpretações baseadas exclusivamente em mortalidade aguda. O clorantraniliprole, um inseticida do grupo das diamidas, é frequentemente classificado como de baixo potencial letal para abelhas quando avaliado em ensaios agudos, apresentando baixa mortalidade em concentrações consideradas

ambientalmente relevantes (Smagge *et al.*, 2013; Morrison *et al.*, 2024). No entanto, esse ingrediente ativo demonstra que a baixa toxicidade em curto prazo não exclui riscos que apenas exposições prolongadas conseguem identificar, evidenciando que os ensaios padronizados de mortalidade possuem limitações para esses casos.

Além disso, resultados obtidos em testes de toxicidade oral reforçam que a magnitude da mortalidade observada depende fortemente da dose e da duração da exposição. Em avaliações conduzidas com inseticidas sistêmicos, como imidacloprido, tiametoxam e flupiradifurona, concentrações elevadas tendem a resultar em mortalidade significativa em curto prazo, enquanto exposições em níveis mais baixos, ainda que ambientalmente plausíveis, podem não provocar morte imediata, dificultando a detecção de efeitos letais em ensaios de curta duração (Reid *et al.*, 2020; Mundy-Heisz; Prosser; Raine, 2022).

Embora a maior parte dos estudos com inseticidas se concentre em ensaios de curta duração, 11 dos 26 artigos analisados adotaram protocolos agudos, conforme descrito no ANEXO I. Resultados obtidos em avaliações conduzidas ao longo de períodos mais prolongados indicam que exposições crônicas ou repetidas, especialmente a neonicotinoides, podem resultar em efeitos letais não detectados em testes agudos padronizados (Spurgeon *et al.*, 2016; Morrison *et al.*, 2024).

Além das diferenças relacionadas conforme a concentração utilizada e o tempo de exposição, a suscetibilidade aos efeitos letais também varia de acordo com o estágio do ciclo de vida avaliado. Nesse sentido, estudos que investigaram exposições repetidas ao longo do tempo indicam uma maior vulnerabilidade de determinados estágios, em especial das rainhas. Morrison *et al.* (2024) demonstraram que exposições sucessivas a inseticidas sistêmicos, incluindo neonicotinoides, mesmo em concentrações que não provocam mortalidade aguda, podem comprometer a sobrevivência de rainhas ao longo do tempo, indicando efeitos letais cumulativos. Considerando que apenas as rainhas são capazes de fundar novas colônias e produzir descendentes férteis, a mortalidade nesse estágio resulta em maiores efeitos sobre a manutenção das populações, uma vez que a capacidade reprodutiva das operárias não é suficiente para substituir a perda da rainha (Mommaerts; Smagge, 2011). Isso indica que focar apenas na sobrevivência de operárias em testes de curta duração pode não refletir os danos reais que o uso de agrotóxicos causa à estrutura e continuidade das colônias de *Bombus* sp.

Além das exposições a ingredientes ativos isolados, Botías *et al.* (2017) demonstraram, a partir de levantamentos conduzidos em campo, que abelhas do gênero *Bombus* estão frequentemente expostas a combinações de agrotóxicos em ambientes agrícolas

e urbanos. Os autores observaram que essa exposição ocorre predominantemente por meio de recursos florais utilizados pelas abelhas, nos quais foram detectados resíduos de múltiplos ingredientes ativos. Entre os compostos identificados destacam-se inseticidas neonicotinoides, como imidacloprido e tiametoxam, além de fungicidas e herbicidas amplamente utilizados em sistemas agrícolas, indicando que a exposição real raramente envolve um único ingrediente ativo.

Spurgeon *et al.* (2016) demonstraram, a partir de ensaios que avaliaram misturas binárias, que a mortalidade observada nessas exposições pode diferir daquela registrada para os ingredientes ativos isolados, tanto em intensidade quanto em tempo de resposta. Nesse estudo, a exposição de *B. terrestris* a combinações como clotianidina e dimetoato ou clotianidina e propiconazol resultou em um aumento da mortalidade ao longo de um período de 240 horas (10 dias). Os resultados indicaram que a toxicidade pode aumentar em pelo menos 5 vezes quando o teste é estendido das 48 horas iniciais para as 240 horas de exposição crônica. Mesmo quando os ingredientes ativos isolados não provocaram mortalidade expressiva em testes agudos, a exposição prolongada por 10 dias revelou efeitos letais cumulativos, com padrões de toxicidade que podem ser até uma ordem de magnitude superiores aos previstos em testes de curto prazo. Esses resultados indicam que interações entre compostos podem intensificar os efeitos letais, particularmente em cenários de exposição prolongada.

Em avaliações conduzidas com misturas em concentrações ambientalmente relevantes, ou seja, em doses equivalentes às detectadas em resíduos de pólen e néctar em áreas agrícolas, a mortalidade observada não pode ser atribuída apenas à soma direta dos efeitos dos ingredientes ativos isolados (Botías *et al.*, 2017). Os resultados variam entre efeitos sinérgicos e respostas semelhantes às observadas para compostos individuais, dependendo da composição da mistura e do desenho experimental, como o fornecimento de dieta contaminada por períodos prolongados (Azpiazu *et al.*, 2023). Essa variabilidade reforça a complexidade da avaliação de risco em cenários que simulam a exposição real de campo.

Nesse contexto, a predominância de protocolos regulatórios baseados na avaliação de ingredientes ativos isolados não prevê adequadamente os riscos associados à mortalidade de *Bombus* sp. em ambientes agrícolas. A exposição simultânea a vários inseticidas, aliada à possibilidade de efeitos letais cumulativos ou interativos, indica que abordagens focadas apenas em testes de toxicidade simples tendem a não representar de forma adequada os cenários reais enfrentados por essas abelhas (Spurgeon *et al.*, 2016; Botías *et al.*, 2017).

Embora ensaios agudos com ingredientes ativos isolados forneçam informações importantes para a caracterização inicial do perigo, esse tipo de abordagem apresenta limitações quando considerado de forma isolada. Os estudos aqui reunidos, ao considerarem rainhas e exposições crônicas, reforçam que os protocolos tradicionais de mortalidade aguda acabam subestimando os impactos que ocorrem nos cenários reais do campo (Spurgeon *et al.*, 2016; Botías *et al.*, 2017; Morrison *et al.*, 2024). Sob essa perspectiva, a compreensão dos riscos associados aos inseticidas exige a análise de fatores que vão além da letalidade imediata, como os efeitos de diferentes regimes de exposição e a interação com outras classes de agrotóxicos, conforme discutido a seguir.

3.1.2 Fungicidas

Entre os 23 artigos que abordaram mortalidade em *Bombus* sp., apenas seis investigaram os efeitos de fungicidas (ANEXO I). Nesses, a mortalidade foi avaliada em conjunto com outros resultados, como efeitos subletais ou interações com outros agrotóxicos, não havendo trabalhos que tenham considerado exclusivamente a mortalidade como único parâmetro de avaliação.

Ainda assim, a análise dessa classe é fundamental, visto que o uso de fungicidas tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, frequentemente superando a aplicação de inseticidas em volume e frequência (Belsky; Joshi, 2020). Além disso, a recorrência com que esses produtos são detectados em recursos florais indica que a exposição raramente ocorre de forma pontual ou restrita a um único ingrediente ativo, o que justifica sua inclusão nas avaliações de risco (Botías *et al.*, 2017).

Nesse contexto, Gradish *et al.* (2009) e Belsky e Joshi (2020) avaliaram a mortalidade de *Bombus* sp. em conjunto com parâmetros de desenvolvimento das colônias, como a produção de novas operárias e a biomassa do ninho. Nesses estudos, a mortalidade associada à exposição isolada permaneceu baixa ou ausente em testes de curta duração (entre 24 e 48 horas para efeitos agudos, ou até 7 dias em protocolos laboratoriais), especialmente em doses compatíveis com as recomendadas em campo. Fungicidas como azoxistrobina e clorotalonil, por exemplo, não apresentaram efeitos letais expressivos sob essas condições. Esses resultados sustentam a interpretação de que fungicidas apresentam risco letal direto limitado para *Bombus* sp. quando comparados a inseticidas, embora esse impacto varie conforme o ingrediente ativo e o desenho experimental adotado (Gradish *et al.*, 2009; Belsky; Joshi, 2020).

Durante o forrageamento em campo, sobretudo em áreas agrícolas, abelhas *Bombus* sp. são expostas simultaneamente a vários fungicidas, na maioria das vezes associados a outros agrotóxicos, uma vez que esses produtos são aplicados periodicamente em lavouras de manejo convencional. A ocorrência frequente de resíduos de fungicidas em recursos florais e em tecidos de abelhas mostra que a exposição ocorre de forma contínua e combinada, e não como eventos isolados (Botías *et al.*, 2017; Azpiazu *et al.*, 2023). Esse cenário de exposição múltipla ajuda a explicar porque resultados obtidos com ingredientes ativos isolados nem sempre refletem adequadamente os níveis de mortalidade observados em ambientes agrícolas.

A presença de fungicidas em misturas com outros agrotóxicos pode modificar o perfil de toxicidade dessas exposições. Spurgeon *et al.* (2016) demonstraram que determinados fungicidas, como a azoxistrobina, podem atuar como moduladores da toxicidade ao interferir em vias de desintoxicação, reduzindo a capacidade das abelhas de metabolizar e eliminar inseticidas quando os compostos são ingeridos simultaneamente. De forma semelhante, Azpiazu *et al.* (2023) observaram aumento da mortalidade ao longo do tempo em microcolônias expostas a misturas contendo fungicidas e inseticidas, mesmo quando os ingredientes ativos avaliados isoladamente não resultaram em mortalidade significativa. Esses resultados indicam que fungicidas podem potencializar efeitos letais de outros agrotóxicos em cenários de exposição crônica.

Dessa forma, embora os fungicidas raramente se destaquem como agentes letais isolados para *Bombus* sp., assumem importância quando se considera a frequência de exposição, a ocorrência simultânea de múltiplos produtos e a possibilidade de efeitos combinados. Nesse sentido, a avaliação de risco se torna mais precisa quando considera como esses agrotóxicos modulam a toxicidade de misturas ao longo do tempo, indo além do que os testes isolados e agudos conseguem prever (Spurgeon *et al.*, 2016; Botías *et al.*, 2017; Azpiazu *et al.*, 2023).

3.1.3 Herbicidas

A avaliação da mortalidade associada à exposição a herbicidas em *Bombus* sp. ocupa menor destaque na literatura quando comparada a inseticidas e fungicidas. A mortalidade associada à exposição a herbicidas foi abordada em apenas seis dos 23 artigos analisados (ANEXO I). Nesses estudos, a mortalidade não constituiu a única variável avaliada, as investigações focaram em efeitos crônicos sobre a longevidade (se estendendo por até 10 dias de observação) e em alterações fisiológicas. Tais dados reforçam que os efeitos letais diretos

de herbicidas sobre *Bombus* sp. são pouco frequentes em exposições isoladas, se manifestando predominantemente de forma tardia ao comprometer a viabilidade dos indivíduos ao longo do tempo (Belsky; Joshi, 2020).

Ainda assim, o uso extensivo de herbicidas na agricultura, sendo esta a classe de agrotóxicos mais aplicada mundialmente, e sua utilização ao longo de diferentes estágios fenológicos das culturas indicam que a exposição de *Bombus* sp. ocorre de forma contínua e persistente no ambiente (Belsky; Joshi, 2020). Dessa forma, mesmo na ausência de efeitos letais agudos imediatos, a análise dessa classe é fundamental para a compreensão dos riscos associados à exposição prolongada, que pode resultar em efeitos tardios sobre a longevidade e a viabilidade dos indivíduos (Azpiazu et al., 2023; Kaakinen *et al.*, 2024).

Avaliações conduzidas com herbicidas amplamente utilizados, como aqueles à base de glifosato, demonstraram que, quando avaliados de forma isolada em testes de curta duração, frequentemente restritos a 48 ou 96 horas, esses produtos não provocam mortalidade aguda significativa em espécies do gênero *Bombus*, com sobrevivência semelhante entre grupos expostos e controle (Kaakinen *et al.*, 2024). Esses resultados fundamentaram a interpretação de que herbicidas apresentam baixo potencial letal direto para abelhas quando considerados de forma isolada.

Em avaliações conduzidas em períodos mais prolongados, Kaakinen *et al.* (2024) observaram que a exposição a herbicidas pode reduzir a longevidade das abelhas, principalmente sob regimes de exposição contínua ou repetida. Esses efeitos tendem a se manifestar de forma tardia, não sendo identificados em protocolos focados exclusivamente em mortalidade aguda, o que corrobora a necessidade de abordagens mais amplas de avaliação de risco em cenários de exposição prolongada (Belsky; Joshi, 2020; Azpiazu *et al.*, 2023).

Portanto, os resultados observados para herbicidas indicam que os prejuízos à sobrevivência podem ser cumulativos, reforçando a importância de análises que vão além dos testes de toxicidade imediata para que os impactos em sistemas agrícolas sejam compreendidos de forma integral.

3.2 Efeitos no comportamento

Os efeitos comportamentais são parâmetros amplamente utilizados em avaliações ecotoxicológicas com abelhas, pois permitem a identificação de alterações biológicas que antecedem a mortalidade e que não são detectadas por protocolos focados exclusivamente em

efeitos letais. Diferente dos efeitos letais, mudanças no comportamento podem ocorrer em concentrações subletais e em períodos curtos de exposição, afetando funções essenciais como forrageamento, aprendizagem, orientação e interação social. Dessa forma, a análise desses efeitos contribui para a compreensão dos riscos associados à exposição a agrotóxicos, especialmente em situações nas quais a mortalidade não é observada a curto prazo (Mommaerts, Smagghe, 2011; Spurgeon *et al.*, 2016).

Dos 31 artigos selecionados nesta revisão, 20 abordaram efeitos comportamentais em abelhas do gênero *Bombus*. Desses, dois tiveram o comportamento como único parâmetro avaliado, enquanto 18 também investigaram outros parâmetros, como mortalidade e/ou alterações morfofisiológicas (ANEXO I).

Alterações comportamentais nesse grupo de abelhas têm sido associadas a interferências em processos neurofisiológicos e metabólicos, resultando em comprometimento do desempenho individual e conseqüentemente, da funcionalidade da colônia. Mesmo quando não resultam em morte direta, esses efeitos podem reduzir a eficiência na coleta de recursos, afetar o cuidado com a prole e comprometer a reprodução, com reflexos sobre a manutenção das populações ao longo do tempo (Mommaerts; Smagghe, 2011; Camp; Lehmann, 2021).

Além disso, as respostas comportamentais variam significativamente conforme o modo de ação do ingrediente ativo, a dosagem utilizada e o tempo de exposição ao qual as abelhas são submetidas. Inseticidas neurotóxicos concentram a maior parte dos estudos comportamentais em *Bombus* sp. (ANEXO I), mas fungicidas e herbicidas também têm sido associados a alterações subletais, especialmente em contextos de exposição contínua ou combinada (Spurgeon *et al.*, 2016; Dennis; Gibbs, 2025).

3.2.1 Inseticidas

Os inseticidas estão presentes na maior parte das pesquisas que avaliam efeitos comportamentais em abelhas do gênero *Bombus*, refletindo tanto sua ampla utilização agrícola quanto seu modo de ação predominantemente neurotóxico. Entre os 20 artigos que investigaram efeitos comportamentais em *Bombus* sp., 18 concentraram-se em inseticidas. Desses, dois avaliaram exclusivamente parâmetros comportamentais, enquanto os demais integraram o comportamento a outros desfechos, como sobrevivência e efeitos morfofisiológicos (ANEXO I).

A exposição a inseticidas pode comprometer processos cognitivos e sensoriais em *Bombus* sp., incluindo aprendizagem, memória e resposta a estímulos alimentares (Mommaerts; Smagghe, 2011; Spurgeon *et al.*, 2016). Alterações na resposta à sacarose e prejuízos na formação de memória associativa foram observados após a exposição a inseticidas sistêmicos, como neonicotinoides e butenolideos, indicando elevada sensibilidade desses parâmetros comportamentais (Tasei; Lerin; Ripault, 2000; Gray; Hulsey; Siviter, 2024). Esses efeitos têm implicações diretas sobre o forrageamento, uma vez que reduzem a capacidade das abelhas de localizar, avaliar e explorar recursos florais de forma eficiente.

Em estudos realizados com microcolônias, a exposição a inseticidas como imidacloprido, azadiractina e flupiradifurona esteve associada à redução do cuidado com a prole, a alterações nos padrões de postura de ovos e ao prejuízo na ativação ovariana das operárias, o que limita a produção de novas larvas, mesmo quando a sobrevivência das operárias não foi afetada. Esses efeitos comportamentais podem estar relacionados a prejuízos no metabolismo energético, uma vez que o funcionamento adequado de comportamentos como cuidado larval, oviposição e manutenção da colônia depende de elevada demanda energética, fortemente associada à atividade mitocondrial em tecidos musculares e neurais. Assim, prejuízos na função mitocondrial podem reduzir a disponibilidade de energia para a execução desses comportamentos, resultando em decréscimos funcionais observáveis em nível de colônia (Laycock *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2023).

A exposição a inseticidas neonicotinoides, como imidacloprido, foi associada a prejuízos no comportamento de vibração (*buzz pollination*) em *Bombus* sp., essencial para a polinização de diversas plantas nativas e cultivadas. Mesmo em doses subletais, esses compostos podem comprometer a coleta de pólen ao alterar a frequência e a duração das vibrações, com potenciais efeitos negativos sobre a produtividade de culturas dependentes desse mecanismo (Switzer; Combes, 2016).

Os efeitos comportamentais também incidem sobre outros estágios do ciclo de vida. Em rainhas, a exposição repetida a inseticidas sistêmicos, como flupiradifurona e neonicotinoides, prejudica a execução de tarefas críticas para a fundação de novos ninhos, o que reduz o sucesso de estabelecimento das colônias, mesmo quando a sobrevivência imediata das rainhas não é afetada (Morrison *et al.*, 2024). Esses resultados reforçam que alterações comportamentais durante a fase de fundação podem gerar consequências relevantes para a dinâmica populacional dessas abelhas.

Em cenários que se aproximam das condições ambientais reais, a exposição a inseticidas ocorre frequentemente em combinação com outros agrotóxicos. Estudos que avaliaram misturas contendo neonicotinoides, como imidacloprido e tiametoxam, associados a fungicidas ou a outros inseticidas sistêmicos, observaram alterações mais pronunciadas no comportamento de forrageamento, na atividade locomotora e na exploração de recursos florais, quando comparadas à exposição a ingredientes ativos isolados (Spurgeon *et al.*, 2016; Botías *et al.*, 2017). Esses resultados indicam que os efeitos comportamentais podem ser intensificados ou modificados pela presença simultânea de múltiplos compostos no ambiente.

Dessa forma, pesquisas que investigam o comportamento em *Bombus* sp. indicam que os efeitos associados à exposição a inseticidas são frequentes, ocorrem em concentrações subletais e afetam funções centrais para o desempenho individual e coletivo. Esses efeitos podem anteceder a mortalidade e não são detectados adequadamente por protocolos focados exclusivamente em sobrevivência, destacando a importância da inclusão de parâmetros comportamentais na avaliação de risco de inseticidas para abelhas do gênero *Bombus* (Mommaerts; Smagghe, 2011; Spurgeon *et al.*, 2016).

3.2.2 Fungicidas

Os estudos que avaliam efeitos comportamentais de fungicidas em *Bombus* sp. são menos frequentes quando comparados aos inseticidas. Os efeitos comportamentais associados à exposição a fungicidas foram abordados em cinco dos 20 artigos analisados. Nesses estudos, o comportamento foi avaliado em conjunto com outros parâmetros biológicos, como sobrevivência e alterações morfofisiológicas, em desenhos experimentais que incluíram exposições isoladas ou combinadas com outros agrotóxicos (ANEXO I).

Belsky e Joshi (2020), em uma revisão abrangente sobre os efeitos de agrotóxicos em abelhas, relatam que fungicidas avaliados de forma isolada, como azoxistrobina e clorotalonil, tendem a não provocar alterações comportamentais detectáveis em *Bombus* sp. em ensaios de curta duração, especialmente quando aplicados em concentrações compatíveis com as recomendações agrícolas. Nesse trabalho, os autores sintetizam resultados de estudos experimentais que avaliaram diferentes parâmetros biológicos, incluindo sobrevivência, comportamento e desempenho da colônia, em delineamentos experimentais que consideraram principalmente exposições isoladas a fungicidas. A revisão destaca que, nesse contexto, o comportamento raramente foi afetado, o que é consistente com a ausência de estudos que

tenham investigado alterações comportamentais como variável de resposta primária exclusiva para essa classe de produtos.

Em condições de campo, no entanto, a exposição a fungicidas ocorre de forma contínua durante o forrageamento e, predominantemente, associada a outros agrotóxicos. Botías *et al.* (2017) demonstraram que resíduos de fungicidas são frequentemente detectados em recursos florais utilizados por *Bombus* sp., indicando que os efeitos comportamentais observados em ambientes agrícolas tendem a resultar de exposições combinadas, e não apenas da ação de ingredientes ativos avaliados isoladamente.

De acordo com Spurgeon *et al.* (2016), nesses cenários de exposição múltipla, fungicidas podem influenciar o comportamento de *Bombus* sp. de forma indireta, ao modificar a resposta das abelhas a outros compostos presentes no ambiente. Determinados fungicidas, como azoxistrobina, podem reduzir a capacidade das abelhas de metabolizar e eliminar inseticidas, o que potencializa alterações comportamentais relacionadas ao forrageamento, à atividade locomotora e ao cuidado com a prole quando os produtos são ingeridos simultaneamente (Spurgeon *et al.*, 2016). Quando avaliados de forma isolada, esses mesmos fungicidas tendem a não provocar alterações comportamentais detectáveis, reforçando que seus efeitos emergem principalmente em contextos de mistura.

De forma geral, estudos que abordam a exposição de *Bombus* sp. a fungicidas em condições de campo e em ensaios com misturas indicam que esses produtos raramente atuam como agentes comportamentais primários, mas assumem relevância quando se considera a frequência de exposição e a ocorrência simultânea com outros agrotóxicos (Spurgeon *et al.*, 2016; Botías *et al.*, 2017). Assim, para que os riscos dos fungicidas em sistemas agrícolas sejam representados de forma mais realista, é fundamental que as avaliações comportamentais incluam cenários de exposição combinada.

3.2.3 Herbicidas

Estudos que abordam efeitos comportamentais de herbicidas em *Bombus* sp. são menos frequentes quando comparados aos inseticidas e fungicidas, refletindo a menor atenção dada a essa classe nas avaliações comportamentais. Apenas seis dos 20 artigos que abordaram efeitos comportamentais em *Bombus* sp. investigaram a exposição a herbicidas (ANEXO I). Nesses estudos, as alterações comportamentais não foram avaliadas de forma isolada, mas associadas a efeitos fisiológicos ou funcionais observados em exposições

prolongadas, indicando que os impactos comportamentais de herbicidas tendem a emergir de forma indireta e tardia.

Kaakinen *et al.* (2023) demonstraram que a exposição a herbicidas pode afetar o comportamento de forma indireta, como consequência de alterações fisiológicas que comprometem o desempenho das abelhas ao longo do tempo. Nesse estudo, produtos à base de glifosato foram associados a prejuízos em processos de aprendizagem e memória em *Bombus* sp., efeitos que se manifestaram principalmente após períodos mais prolongados de exposição, e não em avaliações agudas.

Além dos efeitos cognitivos, alterações estruturais e funcionais na musculatura de voo foram descritas após a exposição a herbicidas, com potenciais impactos sobre a capacidade de voo, a termorregulação e o forrageamento. Abdalla *et al.* (2016) demonstraram que a exposição ao glifosato pode comprometer a integridade da musculatura indireta de voo em operárias de *B. morio*, resultando em processos degenerativos nas fibras musculares. Essas lesões levam à redução do desempenho locomotor e da eficiência de voo, o que pode limitar a capacidade das operárias de explorar recursos florais e manter a atividade forrageadora. Essas alterações funcionais, embora não classificadas como comportamentais de forma direta, têm consequências claras sobre a organização e o desempenho da colônia ao restringirem a coleta de alimento e a manutenção das atividades essenciais (Abdalla *et al.*, 2016).

De forma geral, os resultados disponíveis indicam que a exposição a herbicidas não costuma provocar alterações comportamentais imediatas em *Bombus* sp., mas pode comprometer a execução de comportamentos essenciais de maneira cumulativa e tardia (Abdalla *et al.*, 2016; Kaakinen *et al.*, 2024). Assim, a compreensão dos impactos de herbicidas depende de análises que acompanhem efeitos tardios e prolongados, visto que avaliações de curto prazo podem não identificar prejuízos que comprometem o funcionamento da colônia ao longo do tempo.

3.3 Efeitos na Morfofisiologia

Dos 31 artigos selecionados nesta revisão, 20 investigaram efeitos morfofisiológicos em abelhas do gênero *Bombus*. Desses, quatro tiveram a morfofisiologia como único desfecho avaliado, enquanto 16 também integraram análises morfofisiológicas a outros parâmetros, como mortalidade e comportamento (ANEXO I).

Os efeitos morfofisiológicos constituem um conjunto relevante de parâmetros na avaliação dos impactos de agrotóxicos sobre abelhas, pois permitem identificar alterações

estruturais e funcionais que não são detectadas por avaliações baseadas exclusivamente em mortalidade ou comportamento. Exposições subletais a diferentes classes de agrotóxicos, como inseticidas, por exemplo imidacloprido, deltametrina e clorantraniliprole, fungicidas como a azoxistrobina e herbicidas à base de glifosato, podem provocar alterações em tecidos e sistemas fisiológicos de *Bombus* sp., incluindo modificações em estruturas neurais, musculares e reprodutivas, refletindo efeitos diretos sobre a integridade funcional desses organismos (Tasei; Lerin; Ripault, 2000; Abdalla *et al.*, 2016; Camp; Lehmann, 2021).

Esses efeitos estão associados a respostas de estresse fisiológico, alterações metabólicas e ao comprometimento de vias celulares envolvidas na manutenção da homeostase, resultando em danos que podem ser detectados antes da expressão de mudanças comportamentais evidentes ou da ocorrência de mortalidade. Avaliações morfofisiológicas possibilitam a identificação de danos celulares, alterações na integridade tecidual e prejuízos em sistemas fisiológicos chave, fornecendo informações sensíveis sobre os impactos subletais da exposição a agrotóxicos. Nesse sentido, tais análises funcionam como indicadores precoces de toxicidade, revelando o comprometimento biológico antes que os prejuízos se tornem clinicamente observáveis em nível individual ou colonial (Camp; Lehmann, 2021).

Alterações morfofisiológicas podem resultar tanto de exposições agudas quanto de exposições crônicas ou repetidas. Em regimes de exposição prolongada, danos cumulativos a tecidos e sistemas fisiológicos, como a musculatura de voo, o sistema nervoso e os tecidos reprodutivos, podem comprometer o desempenho individual das abelhas (Abdalla *et al.*, 2016; Provase *et al.*, 2024). Esses danos podem prejudicar processos essenciais como a coordenação motora e o cuidado parental, com reflexos diretos sobre a sobrevivência e a manutenção das colônias ao longo do tempo (Richardson *et al.*, 2025). Além disso, a persistência de resíduos de fungicidas e herbicidas no solo amplia o cenário de risco, atingindo inclusive rainhas em períodos críticos de hibernação (Rondeau *et al.*, 2022).

Outro aspecto relevante é que as respostas morfofisiológicas também variam conforme o ingrediente ativo avaliado e o estágio do ciclo de vida das abelhas, sendo ainda influenciadas por diferenças interespecíficas e intraespecíficas. Esses fatores reiteram a necessidade de análises específicas para o gênero *Bombus*, uma vez que extrapolações baseadas exclusivamente em *A. mellifera* podem não representar adequadamente a suscetibilidade e os padrões de dano observados em mamangavas (Camp; Lehmann, 2021).

Nesse contexto, a avaliação de efeitos morfofisiológicos amplia a compreensão dos impactos dos agrotóxicos sobre *Bombus* sp. ao detalhar danos em níveis celulares e teciduais que precedem os efeitos letais ou as mudanças comportamentais visíveis. Esses parâmetros

forneem subsídios fundamentais para a interpretação dos riscos associados à exposição a diferentes classes de produtos, especialmente em condições que se aproximam dos cenários reais de uso agrícola.

3.3.1 Inseticidas

Entre os 20 artigos que abordaram efeitos morfofisiológicos em *Bombus* sp., 16 concentraram-se em inseticidas. Desses estudos, dois avaliaram exclusivamente alterações morfofisiológicas, enquanto os demais integraram esses efeitos a parâmetros como mortalidade ou avaliação de comportamento, especialmente em exposições subletais ou repetidas (ANEXO I).

Os inseticidas atuam sobre tecidos e sistemas fisiológicos diretamente relacionados à sobrevivência e ao desempenho, como o sistema nervoso e o sistema reprodutivo (Laycock *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2025). Inseticidas neurotóxicos, como os neonicotinoídes e o fipronil, têm sido amplamente investigados uma vez que sua ação sobre o sistema nervoso central resulta em danos à integridade do DNA e desorganização de neurópilos em regiões cerebrais associadas à memória e aprendizagem (Çakıcı *et al.*, 2023; Provase *et al.*, 2024). Tais alterações, detectáveis mesmo em níveis subletais, comprometem a homeostase tecidual e servem como indicadores sensíveis do impacto desses compostos (Camp; Lehmann, 2021).

Entre os neonicotinoídes, estudos histopatológicos demonstram que a exposição subletal ao tiametoxam promove alterações em regiões cerebrais associadas à integração sensorial e ao processamento de informações. Em operárias de *B. terrestris*, a exposição ao tiametoxam foi associada a alterações nos corpos pedunculados, estruturas envolvidas na aprendizagem e na memória, com aumento de dano celular conforme a dose, além de modificações em áreas relacionadas à visão e à percepção química (Çakıcı *et al.*, 2023). Esses resultados indicam que mesmo exposições subletais podem comprometer a integridade de regiões neurais sensíveis ao processamento sensorial.

Outros inseticidas com modos de ação distintos também têm sido associados a alterações morfofisiológicas no sistema nervoso. Em *B. atratus*, a exposição ao fipronil (classe das fenilpirazóis) induziu dano ao DNA em células neurais, avaliado por ensaio cometa, além de alterações estruturais em regiões cerebrais relacionadas ao processamento sensorial e à aprendizagem, incluindo os corpos pedunculados (Provase *et al.*, 2024). Esses achados reforçam que diferentes ingredientes ativos, mesmo pertencentes a classes químicas

distintas, como neonicotinoides e fenilpirazóis, podem convergir para efeitos adversos sobre tecidos neurais altamente especializados.

Além do sistema nervoso, os inseticidas também promovem alterações morfofisiológicas associadas à reprodução, frequentemente avaliadas em ensaios com microcolônias. Em microcolônias de *B. terrestris* expostas ao imidacloprido via oral, foi observada redução progressiva na produção de prole em função do nível de exposição, enquanto o desenvolvimento ovariano permaneceu preservado na maioria das concentrações testadas, com efeito evidente apenas na dose mais elevada de 125 ugL (Laycock *et al.*, 2012). Esses resultados indicam que, nas condições avaliadas, a redução na produtividade ocorreu mesmo na ausência de alterações ovarianas evidentes. Dessa forma, sugerindo que o declínio reprodutivo seja decorrente de efeitos neurobiológicos que comprometem a dinâmica social e o comportamento de cuidado com a prole, ou ainda de um déficit energético causado pela redução na ingestão de alimento, o que impede que as operárias invistam recursos na manutenção das larvas, mesmo possuindo capacidade fisiológica para a postura (Laycock *et al.*, 2012; Richardson *et al.*, 2025).

No que diz respeito ao clorantraniliprole, pertencente à classe das diamidas antranílicas, Smaghe *et al.* (2013) observaram que a exposição oral à concentração a partir de 0,4 mgL resultou em comprometimento reprodutivo e em uma clara alteração morfofisiológica, caracterizada por um comportamento letárgico acentuado. Esse efeito é decorrente do modo de ação do composto sobre os receptores de rianodina, que provoca a liberação descontrolada de cálcio intracelular, levando à paralisia muscular e falhas na coordenação motora. Como consequência, as operárias deixam de exibir reações de defesa e reduzem drasticamente a atividade de cuidado com a prole, o que demonstra que o impacto reprodutivo está intrinsecamente ligado ao comprometimento do sistema neuromuscular (Smaghe *et al.*, 2013)

3.3.2 Fungicidas

Os efeitos morfofisiológicos associados à exposição a fungicidas foram investigados em cinco dos 20 artigos analisados (ANEXO I). Em apenas dois desses estudos a morfofisiologia constituiu a variável de resposta primária, enquanto nos demais as alterações foram avaliadas em conjunto com parâmetros funcionais ou metabólicos. Diferente dos inseticidas, os efeitos descritos para fungicidas afetam principalmente os tecidos associados ao metabolismo energético e ao desempenho funcional das abelhas.

Em *B. terrestris*, fungicidas de diferentes classes químicas, como as estrobilurinas (piraclostrobina), benzimidazóis (carbendazim) e triazóis (tebuconazol), foram associados a alterações na função mitocondrial da musculatura de vôo (Syromyatnikov *et al.*, 2017). Esses agrotóxicos induziram o decréscimo na taxa de respiração celular e a despolarização da membrana mitocondrial, além de promoverem o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), indicando prejuízos na produção de energia celular mesmo na ausência de efeitos letais (Syromyatnikov *et al.*, 2017). Esse comprometimento funcional afeta comportamentos essenciais, como o cuidado parental e a alimentação larval, mesmo quando a integridade estrutural dos tecidos é mantida. Assim, os efeitos morfofisiológicos associados aos inseticidas podem prejudicar o desempenho individual das operárias, com reflexos diretos sobre a redução da prole e a atividade da colônia ao longo do tempo (Richardson *et al.*, 2025)

Dessa maneira, pode-se inferir que os fungicidas não se destacam por provocar danos morfofisiológicos severos, mas podem induzir alterações menos evidentes em tecidos sensíveis, especialmente aqueles relacionados ao metabolismo energético.

3.3.3 Herbicidas

A exposição a herbicidas foi abordada em apenas sete dos 20 artigos que investigaram efeitos morfofisiológicos em *Bombus* sp. (ANEXO I), havendo apenas um trabalho que avaliou exclusivamente alterações morfofisiológicas para essa classe de produtos.

Os efeitos morfofisiológicos associados à exposição a herbicidas em *Bombus* sp. têm sido descritos principalmente em relação a alterações estruturais na musculatura de voo. Abdalla *et al.* (2016) observaram modificações severas na organização das fibras musculares e na integridade dos tecidos em *B. morio* após a exposição ao herbicida à base de glifosato. As análises morfológicas e morfométricas revelaram um processo de atrofia muscular, caracterizado pela redução significativa no diâmetro das fibras e pela desorganização das miofibrilas. Além disso, os autores descreveram a presença de núcleos picnóticos e um aumento dos espaços intracelulares, indicando degeneração tecidual. Tais modificações resultam em prejuízos diretos à força de contração e à resistência física, comprometendo funções essenciais como a sustentação do voo, a termorregulação e o deslocamento durante o forrageamento.

Além disso, Kaakinen *et al.* (2023) demonstraram que exposições prolongadas a herbicidas à base de glifosato podem resultar em efeitos tardios, associados à redução da longevidade e da resistência fisiológica das abelhas, indicando que os impactos

morfofisiológicos dessa classe de agrotóxicos tendem a se manifestar ao longo do tempo e não são observados por avaliações de curta duração.

Dessa forma, os resultados apresentados por Abdalla *et al.* (2016) e Kaakinen *et al.* (2023) indicam que herbicidas não se caracterizam por induzir danos morfofisiológicos severos imediatos ao gênero *Bombus*, mas podem promover alterações estruturais e funcionais persistentes, especialmente na musculatura de voo, com implicações para a longevidade, a resistência fisiológica e o desempenho funcional das abelhas em cenários de exposição crônica.

4. CONCLUSÃO

As pesquisas reunidas nesta revisão demonstram que a caracterização de risco de agrotóxicos para abelhas do gênero *Bombus* não deve se basear exclusivamente na avaliação de mortalidade aguda. Os dados evidenciam que os efeitos dos agrotóxicos vão além da letalidade imediata, se manifestando em múltiplos níveis de organização biológica, desde danos moleculares ao DNA e falhas na bioenergética mitocondrial até alterações histológicas na musculatura de vôo e em tecidos neurais. Tais prejuízos morfofisiológicos resultam em déficits funcionais críticos, como a redução da capacidade de forrageamento, a indução de comportamento letárgico e o comprometimento do cuidado com a prole.

A ocorrência desses efeitos em concentrações ambientalmente relevantes indica que a manutenção das populações de *Bombus* sp. pode ser afetada mesmo em cenários que não resultam em morte imediata. Embora a literatura utilize predominantemente espécies exóticas como modelo, os resultados fornecem uma base preditiva para as espécies nativas brasileiras, que apresentam vulnerabilidades fisiológicas semelhantes e carecem de protocolos de proteção específicos.

Nesse sentido, a transição para uma avaliação de risco mais adequada exige a incorporação de regimes de exposição crônica, estudos de multirresíduos e ensaios com microcolônias, permitindo a análise da integridade tecidual e da dinâmica social em conjunto. Portanto, este capítulo evidencia a necessidade de abordagens integrativas no Brasil, que considerem as particularidades biológicas dos polinizadores nativos e os riscos associados aos regimes de exposição reais em sistemas agrícolas.

5. REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. C. *et al.* Efeito do cádmio e do glifosato na musculatura de mamangavas. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 6, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://revistas.univeritas.com/index.php/ctambiente/article/view/3618>.
- ABROL, D. P.; MONDAL, A.; SHANKAR, U. Importance of bumble bees for crop pollination and food security. **Journal of Palynology**, v. 57, p. 9–37, 2021.
- AZPIAZU, C. *et al.* Pesticide residues in nectar and pollen of melon crops: risk to pollinators and effects of a specific pesticide mixture on *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) micro-colonies. **Environmental Pollution**, v. 326, art. 121451, jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.121451>.
- BARBOSA, W. F. *et al.* Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 130–142, jan. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1365-9>.
- BARDA, M. *et al.* Pollination and fruit set of the Protected Designation of Origin apple cv. ‘Delicious Pilafa Tripoleos’ depends on insect pollinators. **Hellenic Plant Protection Journal**, v. 17, p. 59–69, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/hppj-2024-0005>.
- BELSKY, J.; JOSHI, N. K. Effects of fungicide and herbicide chemical exposure on *Apis* and non-*Apis* bees in agricultural landscape. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, art. 81, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00081>.
- BIE, M. *et al.* Advancing sustainable agriculture through bumblebee pollination: bibliometric insights and future directions. **Sustainability**, v. 17, n. 5, art. 2177, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/su17052177>.
- BOTÍAS, C. *et al.* Quantifying exposure of wild bumblebees to mixtures of agrochemicals in agricultural and urban landscapes. **Environmental Pollution**, v. 222, p. 73–82, mar. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.01.001>.
- BRASIL. [Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998]. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 1, 13 fev. 1998. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19605.htm. Acesso em: 7 abr. 2026.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, DF: MAPA, 2019. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- CAMP, A. A.; LEHMANN, D. M. Impacts of neonicotinoids on the bumble bees *Bombus terrestris* and *Bombus impatiens* examined through the lens of an adverse outcome pathway framework. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 2, p. 309–322, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.4939>.
- ÇAKICI, Ö. *et al.* Effects of thiamethoxam on brain structure of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) workers. **Chemosphere**, v. 338, art. 139595, out. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139595>.

DAFNI, A. *et al.* *Bombus terrestris*, pollinator, invasive and pest: an assessment of problems associated with its widespread introductions for commercial purposes. **Applied Entomology and Zoology**, v. 45, n. 1, p. 101–113, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1303/aez.2010.101>.

DE LUCA, P. A.; VALLEJO-MARÍN, M. What's the 'buzz' about? The ecology and evolutionary significance of buzz-pollination. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 4, p. 429–35, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.05.002>. Acesso em: 1 abr. 2026.

DENNIS, D. J.; GIBBS, A. J. The effect of neonicotinoids on bumblebees (*Bombus* spp.): a systematic review. **Frontiers in Bee Science**, v. 3, art. 1657493, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/frbee.2025.1657493>.

FRANÇOSO, E.; OLIVEIRA, F. F. de; ARIAS, M. C. An integrative approach identifies a new species of bumblebee (Hymenoptera: Apidae: Bombini) from northeastern Brazil. **Apidologie**, v. 47, p. 171–185, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0385-7>.

GRADISH, A. E. *et al.* Effect of reduced risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae). **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 142–146, fev. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.1846>.

GRAY, L.; HULSEY, M.; SIVITER, H. Supplementary material from "A novel insecticide impairs bumblebee memory and sucrose responsiveness across high and low nutrition". **The Royal Society**, [S. l.], 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.7158527.v1>.

GIANNINI, T. C. *et al.* Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, n. 2, p. 209–223, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. Brasília, DF: IBAMA, 2017. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/reavaliacao-ambiental/2017/2017-07-25-Manual-IBAMA-ARA-Abelhas-IN0217-WEB.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2026.

JIE, C. *et al.* Flupyradifurone exhibits greater toxicity to the Asian bumblebee *Bombus lantschouensis* compared to the European bumblebee *Bombus terrestris*. **Insects**, v. 16, n. 5, art. 455, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects16050455>.

KAAKINEN, K. *et al.* Effects of glyphosate and glyphosate-based herbicide on learning and memory of the buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 172, n. 4, p. 324–333, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/eea.13418>.

KLEIN, A. M. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303–313, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>.

KLEIN, A. *et al.* **A polinização agrícola por insetos no Brasil: um guia para fazendeiros, agricultores, extensionistas, políticos e conservacionistas**. Freiburg: Albert-Ludwigs

Universität Freiburg, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.6094/UNIFR/151237>. Acesso em: 15 nov. 2025.

LAYCOCK, I. *et al.* Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1937–1945, out. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0927-y>.

MARLETTO, F.; PATETTA, A.; MANINO, A. Laboratory assessment of pesticide toxicity to bumblebees. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 155–158, 2003. Disponível em: <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol56-2003-155-158marletto.pdf>.

MARTINS, A. C. Abordagens históricas no estudo das interações planta-polinizador. **Oecologia Australis**, v. 17, n. 2, p. 229–242, jun. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4257/oeco.2013.1702.05>.

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

MOMMAERTS, V.; SMAGGHE, G. Side-effects of pesticides on the pollinator *Bombus*: an overview. In: STOYTICHEVA, M. (org.). **Pesticides in the Modern World: pesticides use and management**. Rijeka: InTech, 2011. cap. 23, p. 433–460.

MORRISON, M. A. *et al.* Examining the effects of repeated pesticide exposure on bumblebee queen survival and reproduction. **Ecological Solutions and Evidence**, v. 6, art. e70011, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/2688-8319.70011>.

MUNDY-HEISZ, K. A.; PROSSER, R. S. ; RAINE, N. E. Acute oral toxicity and risks of four classes of systemic insecticide to the Common Eastern Bumblebee (*Bombus impatiens*). **Chemosphere**, v. 295, art. 133771, maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133771>.

NERY, D.; PALOTTINI, F.; FARINA, W. M. The South American Black Bumblebee (*Bombus pauloensis*) as a Potential Pollinator of Alfalfa (*Medicago sativa*). **Agriculture**, v. 14, n. 12, art. 2192, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agriculture14122192>.

NOCELLI, R. C. F. *et al.* **Riscos de pesticidas sobre as abelhas**. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2025.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test no. 247: Bumblebee, acute oral toxicity test**. Paris: OECD, 2017. Disponível em: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-no-247-bumblebee-acute-oral-toxicity-test-9789264284128-en.htm>. Acesso em: 11 out. 2023.

OLIVEIRA, M. O. *Bombus* bees as crop pollinators: perspectives of the use of native species on greenhouses in Brazil. **Applied Apple Biometry**, v. 2, n. 2, 2014. Edição especial. Disponível em: <https://doi.org/10.18378/aab.v2i2.3599>.

OLIVEIRA, M. O. *et al.* Evidence of nest reactivation and perennial colonies in the Neotropical bumble bee *Bombus brevivillus* (Hymenoptera: Apidae: Bombini). **Neotropical Entomology**, v. 51, n. 6, p. 886–893, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13744-022-00992-5>.

OLKER, J. H. *et al.* The ECOTOXicology Knowledgebase: A curated database of ecologically relevant toxicity tests to support environmental research and risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 41, n. 6, p. 1520–1539, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.5324>.

PATRÍCIO-ROBERTO, G. B. *et al.* The importance of bees for eggplant cultivations (Hymenoptera: Apidae, Andrenidae, Halictidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 3, 2012.

PLATAFORMA BRASILEIRA DE BIODIVERSIDADE E SERVIÇOS ECOSISTÊMICOS (BPBES); REDE BRASILEIRA DE INTERAÇÕES PLANTA-POLINIZADOR (REBIPP). **Relatório temático sobre polinizadores, polinização e produção de alimentos**. São Carlos: BPBES/REBIPP, 2019. Disponível em: https://www.bpb.es.net.br/wp-content/uploads/2019/03/BPBES_CompletoPolinizacao-2.pdf. Acesso em: 11 out. 2025.

PLATH, O. E. The role of bumblebees in the pollination of certain cultivated plants. **The American Naturalist**, v. 59, n. 664, p. 441–451, 1925.

POTSCHIN, M. B.; HAINES-YOUNG, R. H. Ecosystem services: Exploring a geographical perspective. **Progress in Physical Geography**, v. 35, n. 5, p. 575–594, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0309133311423172>. Acesso em: 21 abr. 2026.

PROVASE, M. *et al.* Impact of environmental concentrations of fipronil on DNA integrity and brain structure of *Bombus atratus* bumblebees. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 110, art. 104536, ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2024.104536>.

REID, R. J. *et al.* Assessing the acute toxicity of insecticides to the buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris audax*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 166, art. 104562, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104562>.

RICHARDSON, L. I. *et al.* Field-realistic exposure to the novel insecticide flupyradifurone reduces reproductive output in a bumblebee (*Bombus impatiens*). **Journal of Applied Ecology**, v. 61, n. 8, p. 1776–1787, ago. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.14706>.

RICHARDSON, L. I. *et al.* Bumblebees exposed to a novel ‘bee-safe’ insecticide have impaired alloparental care and reproductive output. **Insectes Sociaux**, v. 72, art. 1054, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00040-025-01054-w>.

RONDEAU, S. *et al.* Quantifying exposure of bumblebee (*Bombus* spp.) queens to pesticide residues when hibernating in agricultural soils. **Environmental Pollution**, v. 309, art. 119722, set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119722>.

ROUBIK, D. W. **The pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners**. Rome: FAO, 2018.

SARAIVA, A. M. *et al.* *Bombus terrestris* na América do Sul: possíveis rotas de invasão deste polinizador exótico até o Brasil. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. *et al.* (org.). **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: Edusp, 2012. cap. 10, p. 203–212.

SCHMID-HEMPEL, P. *et al.* Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. **Heredity**, v. 99, n. 4, p. 414–422, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801017>.

SMAGGHE, G. *et al.* Dietary chlorantraniliprole suppresses reproduction in worker bumblebees. **Pest Management Science**, v. 69, n. 7, p. 787–791, jul. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.3504>.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. **Uso de agrotóxicos no Brasil: uma análise integrada**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2021.

SPURGEON, D. *et al.* **Chronic oral lethal and sub-lethal toxicities of different binary mixtures of pesticides and contaminants in bees (*Apis mellifera*, *Osmia bicornis* and *Bombus terrestris*)**. Parma: EFSA, 2016. (EFSA Supporting Publication 2016:EN-1008). Disponível em: <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1008>.

SYROMYATNIKOV, M. Y. *et al.* Evaluation of the toxicity of fungicides to flight muscle mitochondria of bumblebee (*Bombus terrestris* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 41–46, jan. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.06.007>.

SWITZER, C. M.; COMBES, S. A. The neonicotinoid pesticide, imidacloprid, affects *Bombus impatiens* (bumblebee) sonication behavior when consumed at doses below the LD50. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 6, p. 1150–1159, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1669-z>.

TASEI, J.-N.; LERIN, J.; RIPAUULT, G. Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae), during a laboratory feeding test. **Pest Management Science**, v. 56, n. 9, p. 784–788, 2000.

VELTHUIS, H. H. W.; DOORN, A. van. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. **Apidologie**, v. 37, n. 4, p. 421–451, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/apido:2006019>.

CAPÍTULO 2

Impacto do clorantraniliprole em *Bombus morio* (Swederus, 1787): Adaptação de Protocolos de Manutenção Laboratorial e Avaliação de Mortalidade

RESUMO

As abelhas do gênero *Bombus* desempenham papel fundamental na polinização de diversas culturas agrícolas, porém permanecem pouco representadas em estudos ecotoxicológicos, especialmente no Brasil. Nesse contexto, este estudo teve como objetivo adaptar metodologias laboratoriais para a espécie nativa *Bombus morio* e avaliar a toxicidade oral do inseticida clorantraniliprole, gerando dados para a avaliação de risco ambiental. Para isso, foram desenvolvidos e padronizados sistemas de contenção e alimentação compatíveis com as características morfológicas e comportamentais da espécie, além da condução de ensaios de longevidade em condições controladas. Posteriormente, foram realizados testes de toxicidade oral com duas concentrações do inseticida, definidas com base em parâmetros ecotoxicológicos e cenários de exposição ambiental. Os resultados demonstraram que *B. morio* apresenta elevada tolerância ao confinamento, com longevidade média de aproximadamente 30 dias em laboratório. A exposição ao clorantraniliprole não resultou em mortalidade estatisticamente significativa após 48 horas, em nenhuma das concentrações testadas, indicando baixa toxicidade aguda nas condições avaliadas. De forma geral, os resultados indicam que, embora o clorantraniliprole apresente baixa letalidade para *B. morio*, a utilização de protocolos baseados exclusivamente em mortalidade pode não ser suficiente para a detecção de efeitos subletais. Além disso, o estudo demonstra a viabilidade do uso de espécies nativas em ensaios laboratoriais, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens ecotoxicológicas mais representativas para o contexto brasileiro.

Palavras-chave: Mamangava, ecotoxicologia, efeitos subletais, inseticida.

ABSTRACT

Bees of the genus *Bombus* play a key role in the pollination of several agricultural crops; however, they remain underrepresented in ecotoxicological studies, particularly in Brazil. In this context, this study aimed to adapt laboratory methodologies for the native species *Bombus morio* and to evaluate the oral toxicity of the insecticide chlorantraniliprole, generating data for environmental risk assessment. To this end, containment and feeding systems compatible with the morphological and behavioral characteristics of the species were developed and standardized, along with the implementation of longevity assays under controlled conditions. Subsequently, oral toxicity tests were conducted using two concentrations of the insecticide, defined based on ecotoxicological parameters and realistic environmental exposure scenarios. The results demonstrated that *B. morio* exhibits high tolerance to confinement, with an average longevity of approximately 30 days under laboratory conditions. Exposure to chlorantraniliprole did not result in statistically significant mortality after 48 hours at either tested concentration, indicating low acute toxicity under the evaluated conditions. Overall, the findings indicate that although chlorantraniliprole shows low lethality to *B. morio*, the use of protocols based exclusively on mortality may be insufficient to detect sublethal effects. Furthermore, this study demonstrates the feasibility of using native species in laboratory assays, contributing to the development of more representative ecotoxicological approaches for the Brazilian context.

Keywords: Bumblebee, ecotoxicology, sublethal effects, insecticide.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas são fundamentais na manutenção da biodiversidade e na sustentabilidade de sistemas agrícolas, atuando como polinizadoras de uma ampla variedade de plantas silvestres e cultivadas (Potts *et al.*, 2010; IPBES, 2016). Entre os diversos grupos de abelhas, o gênero *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) se destaca pela eficiência na polinização, sobretudo de culturas que requerem polinização por vibração (*buzz pollination*), mecanismo essencial para a formação de frutos em diversos cultivos de alto valor econômico, como o tomate e a berinjela (Patrício, 2013; Cooley; Vallejo-Marín, 2021). No entanto, apesar de sua importância ecológica e econômica, o número de estudos voltados às abelhas do gênero *Bombus* ainda é significativamente inferior em comparação à *A. mellifera*, especialmente na América do Sul (Cecchetto *et al.*, 2023).

O crescente uso de agrotóxicos na agricultura é apontado como um dos principais fatores associados ao declínio de populações de abelhas em todo o mundo (IPBES, 2016; Zattara; Aizen, 2021). Embora os agrotóxicos desempenhem um papel importante no controle de doenças e pragas, contribuindo para a manutenção da produtividade agrícola no curto prazo, seu uso intensivo e, muitas vezes, indiscriminado, pode acarretar efeitos adversos à saúde humana e ao equilíbrio dos ecossistemas (Franco, Pelaez, 2016; Costa, Pires, 2016; Ribeiro *et al.*, 2022).

O Brasil está entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (Spadotto, Gomes, 2021), o que torna ainda mais urgente a investigação dos impactos dessas substâncias sobre a fauna nativa. A maioria das avaliações toxicológicas com polinizadores ainda se concentra em espécies-modelo, como *A. mellifera*, o que limita a extrapolação dos resultados para outras espécies com diferentes fisiologias e comportamentos (Lourencetti *et al.*, 2023), como as abelhas do gênero *Bombus*. É importante destacar que *A. mellifera* pode apresentar maior tolerância a determinados ingredientes ativos quando comparada a abelhas nativas. No estudo de Lourencetti *et al.* (2023), abelhas forrageiras das espécies *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811), *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) e *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) foram mais sensíveis ao inseticida tiametoxam do que *A. mellifera*, indicando que a utilização exclusiva desta espécie em testes toxicológicos pode não refletir adequadamente os riscos enfrentados por outras abelhas, especialmente aquelas nativas. No caso das espécies brasileiras de *Bombus*, essa lacuna de conhecimento ainda persiste.

No Brasil, ocorrem cerca de sete espécies de *Bombus*, sendo uma delas *Bombus morio*, espécie nativa amplamente distribuída no território brasileiro (Françoso, 2015;

Françoso, Oliveira e Arias, 2016). Sua ocorrência em diferentes biomas, aliada ao comportamento generalista no forrageamento e à capacidade de atuar como polinizadora eficiente em diversos cultivos, confere a essa espécie um papel estratégico tanto do ponto de vista ecológico quanto agrícola (Goulson, 2010; Françoso *et al.*, 2016; A.B.E.L.H.A., 2020). No entanto, apesar de sua relevância, *B. morio* ainda é pouco explorada em estudos ecotoxicológicos, o que dificulta a avaliação de riscos ambientais com base em dados representativos da fauna local. Nesse contexto, torna-se fundamental investigar os efeitos de agrotóxicos amplamente utilizados na agricultura nacional sobre *B. morio*.

O clorantniliprole, um inseticida da classe das diamidas, tem se destacado pelo uso recorrente em cultivos economicamente relevantes no Brasil, como soja, milho, algodão, cana-de-açúcar e citros (Brasil, 2019). Segundo Córdova *et al.* (2006), esse inseticida atua na ativação dos receptores de rianodina (RyR) dos insetos, ocasionando deficiência na regulação de contração muscular e na liberação de neurotransmissores. Assim, quando em contato com essa substância, o inseto pode apresentar paralisia, letargia, interrupção alimentar e regurgitação, podendo resultar em sua morte (Haas *et al.*, 2021).

Embora a eficácia agrônômica e a seletividade dos agrotóxicos para pragas-alvo sejam amplamente reconhecidas, estudos recentes têm apontado que mesmo concentrações abaixo das consideradas letais podem provocar efeitos subletais em abelhas, incluindo alterações comportamentais, fisiológicas e morfológicas (Nocelli *et al.*, 2018). Apesar da crescente preocupação com esses impactos, ainda são escassos os protocolos padronizados voltados à avaliação toxicológica em espécies nativas brasileiras, como *B. morio*. Atualmente, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) disponibiliza diretrizes específicas para testes com abelhas do gênero *Bombus*, mas estas são baseadas em *B. terrestris* e *B. impatiens* (OECD, 2017), espécies que não ocorrem no Brasil.

Diante desse cenário, torna-se fundamental ampliar o conhecimento sobre os impactos de ingredientes ativos amplamente utilizados na agricultura nacional, como o clorantniliprole, em espécies nativas de abelhas. Considerando a carência de dados específicos para *B. morio*, este estudo teve como objetivos padronizar um sistema de contenção individual e desenvolver alimentadores específicos para operárias em condições laboratoriais; estabelecer valores de referência para a longevidade da espécie em condições laboratoriais controladas; e investigar os efeitos da exposição oral ao clorantniliprole, em diferentes concentrações, sobre a sobrevivência das abelhas. Dessa forma, busca fornecer dados que subsidiem futuras avaliações de risco e contribuam para a construção de diretrizes mais representativas da realidade brasileira.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

As operárias de *B. morio* foram capturadas no campus da Universidade Federal de São Carlos – Araras (SP), Brasil (22°18'47.46" S, 47°22'47.85" W). Essa espécie foi escolhida por ser a mais abundante na área durante o período amostrado. As coletas foram realizadas entre fevereiro e maio de 2025, abrangendo os períodos da manhã (09:00 às 12:00 h) e final da tarde (após as 16:00 h). Durante o período amostral, as temperaturas médias mensais na região variaram de 25,5°C (fevereiro) a 19,5°C (maio), com picos térmicos de até 32°C nos horários de maior incidência solar (São Paulo, 2025). As capturas foram efetuadas por meio de coleta ativa, utilizando recipientes plásticos com capacidade de 1000 mL posicionados diretamente sobre as flores visitadas, permitindo a contenção imediata dos indivíduos (Figura 1).

Figura 1. Coleta ativa de *B. morio* no campus da UFSCar – Araras (SP).



Fonte: A autoria própria, 2025.

Para não danificar as flores durante a coleta, após o fechamento do recipiente, a abelha era cuidadosamente conduzida para o lado oposto ao da flor, e então esta era retirada manualmente do pote com cautela, preservando sua integridade. Esse procedimento evitava o acúmulo de material vegetal no interior das gaiolas e facilitava a posterior manutenção dos indivíduos no laboratório.

Após a captura, as abelhas foram mantidas individualmente nos mesmos recipientes utilizados na coleta, visando reduzir o estresse e evitar competições hierárquicas entre os indivíduos. Desde o transporte até o início dos bioensaios, a temperatura e a umidade relativa foram controladas de acordo com as diretrizes da OECD nº 247 (2017), mantendo-se em 25 ± 2 °C e $60 \pm 20\%$, respectivamente, conforme descrito nos itens subsequentes.

2.2 Transporte e manutenção dos indivíduos

Após a coleta, os recipientes contendo os indivíduos coletados em campo, foram transportados em caixas térmicas até o laboratório, para evitar mudanças acentuadas de temperatura. Os experimentos foram conduzidos em estufa para demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O), com temperatura controlada (25 ± 2 °C) e umidade relativa (UR) de $60 \pm 20\%$, onde cada abelha foi mantida em gaiola individual (Figura 2).

Durante o período de aclimação, que durou 24 horas antes do início dos testes, os indivíduos tiveram acesso à alimentação *ad libitum*, composta por solução açucarada (50% v/v). Apenas os indivíduos que se apresentavam saudáveis e ativos nas primeiras 12 horas de aclimação foram selecionados para os experimentos. Aqueles que apresentaram danos físicos, imobilidade ou letargia foram excluídos e soltos no local de coleta. A utilização de ambientes padronizados e condições controladas foi fundamental para garantir a confiabilidade dos bioensaios e reduzir interferências causadas por estresse.

Figura 2. Estufa tipo D.B.O utilizada para manutenção dos indivíduos em condições controladas durante os bioensaios laboratoriais.



Fonte: Autoria própria, 2025.

2.3 Gaiola Experimental

Para a coleta, manutenção e realização dos bioensaios com as abelhas, foram utilizadas gaiolas experimentais confeccionadas a partir de potes plásticos com formato tronco de cone invertido, com capacidade de 1000 mL. Inicialmente, foram testados três modelos de potes plásticos transparentes, com diferentes volumes e formatos (Figura 3): (I) um pote formato tronco de cone invertido de 250 mL, (II) um pote formato tronco de cone invertido de 1000 mL e (III) um pote retangular de 1000 mL.

A gaiola recomendada pelas diretrizes da OECD nº 247 (gaiolas Nicot) foi substituída pelo Modelo II (1000 mL) devido às diferenças biológicas e comportamentais entre a espécie modelo e a nativa. Enquanto os protocolos padronizados utilizam operárias de *B. terrestris* e *B. impatiens* comerciais, indivíduos que não estabeleceram atividade de voo externa e se adaptam facilmente ao confinamento em pequenos volumes, este estudo utilizou operárias forrageiras de *B. morio* capturadas em campo.

Por se tratarem de indivíduos silvestres e ativos na coleta de recursos, observou-se que o confinamento em espaços reduzidos (Modelo I) resultava em elevados níveis de estresse e agitação. Assim, o volume de 1000 mL foi essencial para acomodar o maior porte físico da espécie e respeitar sua necessidade de movimentação, garantindo que a sobrevivência nos bioensaios fosse reflexo apenas dos tratamentos testados, e não do estresse causado pelo confinamento inadequado de uma abelha forrageira.

Figura 3. Três modelos de potes plásticos transparentes testados para a contenção das abelhas.

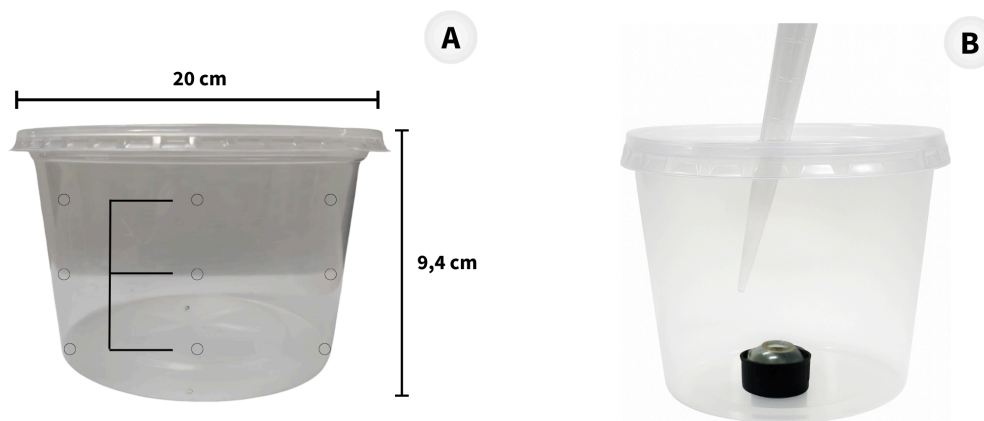


Fonte: Autoria própria, 2025.

As gaiolas foram adaptadas manualmente para atender às necessidades de ventilação e alimentação. A ventilação foi obtida por meio de furos feitos com agulhas metálicas aquecidas (1,20 x 40 mm). Cada recipiente recebeu, em suas laterais, no mínimo, oito fileiras verticais compostas por três orifícios cada, conforme ilustrado na Figura 4A (Nocelli; Malaspina; Roat, [s.d.]). Adicionalmente, foi feito na tampa um orifício de 12 mm para inserção do alimento e para o procedimento de limpeza interna, sem a necessidade de abertura total da gaiola (Figura 3B).

Durante essa fase de testes, foram utilizadas três abelhas, mantidas individualmente em potes distintos, a fim de avaliar a eficiência dos sistemas de contenção e ventilação. Esta última foi verificada pela observação de possíveis acúmulos de umidade nas paredes internas do recipiente.

Figura 4. Gaiola experimental utilizada para a contenção de *B. morio* durante os bioensaios.



(A) Recipiente plástico formato tronco de cone invertido 1000 mL), adaptado com furos verticais (três orifícios por fileira) (B) Sistema de alimentação fixado na base, composto por batoque perfurado encaixado na tampa, no qual foi inserida uma pipeta utilizada para o fornecimento do xarope. Fonte: Autoria própria, 2025.

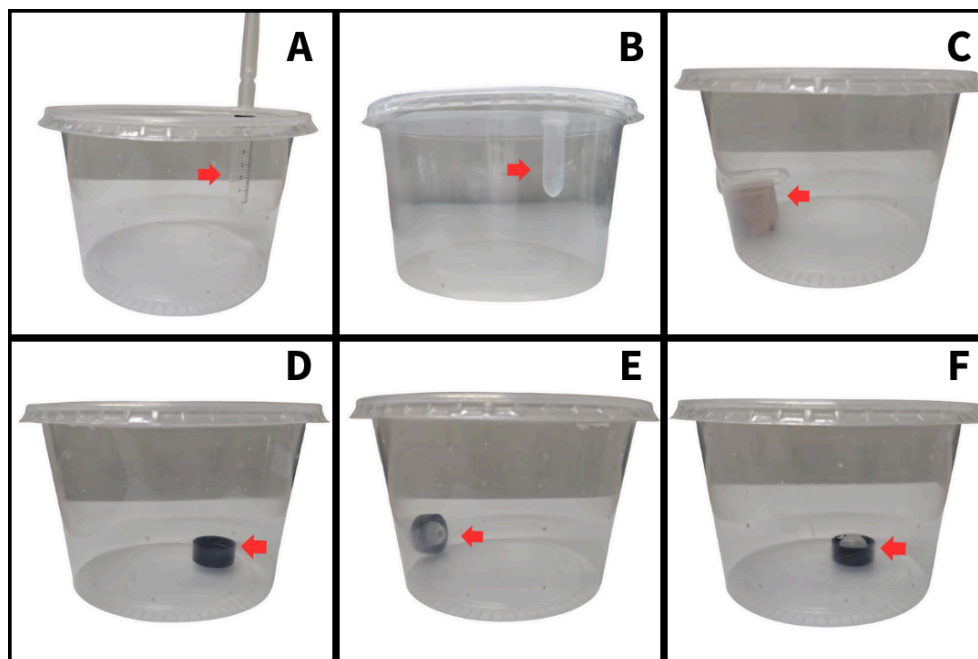
2.4 Alimentadores

Durante a manutenção e os ensaios experimentais, o fornecimento de alimento foi realizado por meio de alimentadores padronizados, confeccionados a partir da adaptação de tampas e batoques plásticos. Foram testados cinco modelos distintos de alimentadores, inseridos exclusivamente nos potes com formato tronco de cone invertido de 1000 mL (Figura 5). Essa escolha deve-se ao fato desse modelo de recipiente ter sido previamente selecionado como o mais adequado para o alojamento da espécie, conforme os resultados da etapa de padronização das gaiolas. Para cada modelo, foram utilizadas três gaiolas, contendo uma abelha por unidade:

- A. Seringa hipodérmica estéril de 5 mL, sem agulha, fixada verticalmente na tampa.
- B. Microtubo plástico de 2 mL, fixado na tampa do pote, perfurado lateralmente com três orifícios (Nocelli; Malaspina; Roat, [s.d.]).
- C. Microtubo de 2 mL posicionado horizontalmente, apoiado sobre um suporte de madeira (aproximadamente 2×2 cm).
- D. Tampas plásticas (1 cm de altura \times 3 cm de profundidade) instaladas no fundo do recipiente.

- E. Tampa plástica acoplada a batoque bolha de 16.5 mm, fixada lateralmente no recipiente.
- F. Tampa plástica acoplada a batoque bolha de 16.5 mm, posicionada no fundo do recipiente.

Figura 5. Configurações dos cinco tipos de alimentadores testados em potes formato tronco de cone invertido de 1000 mL.



Modelos de sistemas de alimentação testados: (A) seringa de 5 mL e (B) microtubo de 2 mL, ambos fixados verticalmente na tampa; (C) microtubo de 2 mL em suporte horizontal; (D) tampa plástica no fundo do pote; (E) tampa com batoque bolha lateral e (F) no fundo do pote. n = 3. Fonte: Autoria própria (2025).

Figura 6. Operária *B. morio* consumindo xarope no sistema de alimentação desenvolvido nos bioensaios.



Fonte: Autoria própria, 2025.

2.4 Teste de sobrevivência em condições controladas

Após o período de aclimação, foram monitorados 25 indivíduos da espécie *B. morio* em condições controladas, sem exposição a agrotóxicos. Esse teste teve como objetivo monitorar a viabilidade dos indivíduos ao longo do tempo, permitindo a avaliação e adequação das condições laboratoriais e da estrutura experimental utilizada.

Os bioensaios foram conduzidos individualmente em gaiolas experimentais (1000 mL), mantidas sob as mesmas condições ambientais descritas anteriormente. Cada abelha recebeu solução açucarada (50% v/v) fornecida *ad libitum* no alimentador compostos por tampa plástica acoplada a batoque bolha de 16,5 mm, posicionados no fundo do recipiente. A solução foi renovada a cada 48h para evitar fermentação ou contaminação. No momento da troca, os alimentadores eram removidos, higienizados com água destilada para a retirada de resíduos e devidamente secos antes do reabastecimento com nova solução.

A mortalidade foi registrada a cada 24 horas até que todos os indivíduos viessem a óbito. Abelhas que não respondiam ao estímulo tátil com pincel de ponta fina foram consideradas mortas.

2.5 Teste de toxicidade oral

Para este teste, foi utilizado o ingrediente ativo clorantraniliprole ($\geq 95,0\%$ de pureza, CAS 500008-45-7, Sigma-Aldrich®). A avaliação da toxicidade foi conduzida por meio da administração oral do ingrediente ativo em operárias de *B. morio*. Para tanto, foram oferecidas soluções aquosas de sacarose a 50% (m/v) contendo clorantraniliprole em duas concentrações, durante um período máximo de 4 horas, conforme o protocolo OECD n° 247 (2017). A mortalidade dos indivíduos foi avaliada após 24 e 48 horas do início da exposição, sendo este último o tempo final considerado para a análise.

As abelhas foram divididas em cinco grupos experimentais: I) Controle negativo (CN; solução de sacarose a 50%); II) Controle positivo (CP; solução de sacarose a 50% + dimetoato, $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); III) Controle do solvente (CS; solução de sacarose a 50% + acetona, 0,258% (v/v)) (Haas *et al.*, 2021); IV) clorantraniliprole - Dose 1 (D1; solução de sacarose a 50% + $1,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); V) clorantraniliprole – Dose 2 (D2; solução de sacarose a 50% + $2,58 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

No total, foram utilizados 15 indivíduos por grupo experimental. Considerando a natureza silvestre de *B. morio* e sua indisponibilidade comercial, a obtenção das abelhas foi restrita a coletas ativas em campo, o que impôs limitações logísticas quanto ao número de indivíduos disponíveis. Dessa forma, o delineamento experimental com 15 espécimes por grupo representa um número amostral viável e compatível com estudos ecológicos e toxicológicos envolvendo espécies não manejadas (Malaspina *et al.*, 2010). Ademais, o número de réplicas foi definido de modo a garantir resultados estatisticamente interpretáveis, respeitando as limitações éticas e logísticas associadas ao manejo de populações silvestres.

No CN, os indivíduos receberam apenas a solução de sacarose a 50% (m/v). O CP foi realizado com a adição de dimetoato ao alimento na concentração de $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, visando validar a sensibilidade do sistema experimental e a adequação das condições do ensaio, conforme exigido pelo protocolo da OECD n° 247 (2017). Como o ingrediente ativo clorantraniliprole não é solúvel em água, o ingrediente ativo foi previamente diluído em acetona e, posteriormente, incorporado à solução açucarada. O CS foi preparado com acetona na concentração de 0,258% (v/v), com objetivo assegurar que a acetona, isoladamente, não interferisse nos resultados obtidos (Haas *et al.*, 2021).

Para definir a D1, foi adotada como referência a LC_{50} de $13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (equivalente a $13 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$), determinada por Smaghe *et al.* (2013), cujo estudo utilizou *B. terrestris* como

espécie modelo. A D1 corresponde a um décimo dessa concentração (1,3 µg/mL), o que possibilitou avaliar a resposta de *B. morio* a uma exposição reduzida do composto, levando em conta as diferenças fisiológicas entre as espécies. Essa estratégia permite detectar efeitos iniciais que podem ocorrer antes da mortalidade, servindo de base para estudos futuros de toxicidade subletal ou crônica.

A D2, por sua vez, correspondeu a uma estimativa de exposição realista ao clorotraniliprole em campo, com base nas recomendações de uso para a cultura da berinjela (*Solanum melongena*), visto que esse cultivo é polinizado por *Bombus* spp. e recebe aplicações de clorotraniliprole (Brasil, 2019). A partir dos parâmetros de aplicação registrados no Brasil e com o auxílio do modelo BeeREX (USEPA), foi estimada uma concentração de 2,58 µg/mL presente no néctar e pólen.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de sobrevivência em condições laboratoriais foi conduzida no R, por meio do método de Kaplan-Meier, permitindo estimar a curva de sobrevivência e a mediana de vida das operárias de *B. morio* mantidas sem exposição a agrotóxicos.

As análises estatísticas dos testes de toxicidade foram realizadas no software R (versão 4.3.3, R Core Team, 2024), adotando-se um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). A normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não apresentaram distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação global das taxas de mortalidade entre os tratamentos. Em seguida, utilizou-se o post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni para identificar diferenças significativas entre pares de tratamentos.

4. RESULTADOS

4.1 Gaiola Experimental

O pote com formato tronco de cone invertido de 250 mL apresentou espaço interno reduzido para as operárias de *B. morio*, o que limitou a movimentação e causou muita agitação, com tentativas frequentes de voo, favorecendo o derramamento do alimento. Essas observações confirmaram que as gaiolas de volume reduzido sugeridas pela OECD 247 não seriam adequadas para este estudo.

Isso ocorre porque os protocolos padronizados utilizam operárias de *B. terrestris* e *B. impatiens* de colônias comerciais, indivíduos que não estabeleceram atividade de voo externa e se adaptam mais facilmente a espaços pequenos. Em contraste, este estudo utilizou operárias forrageiras de *B. morio* capturadas em campo, que são muito mais ativas e demandam maior espaço para não entrarem em estresse.

O pote retangular de 1000 mL, embora tivesse um bom volume, comprometeu a eficiência alimentar devido à sua altura. Diferentemente, o pote formato tronco de cone invertido de 1000 mL apresentou o melhor desempenho, garantindo ventilação adequada e espaço interno suficiente para a livre movimentação e a realização de observações comportamentais sem sinais de estresse. Dessa forma, este modelo foi selecionado para a condução dos experimentos subsequentes, assegurando que a sobrevivência nos bioensaios não fosse influenciada pelo esgotamento físico decorrente do confinamento inadequado, atendendo ao critério de que os indivíduos devem ser mantidos de forma saudável durante o teste.

4.2 Alimentadores

Os alimentadores do tipo seringa (A), microtubo vertical (B) e microtubo sobre suporte de madeira (C) apresentaram desempenho insatisfatório (Figura 4). Apesar da fixação estável, o acesso ao xarope foi ineficiente, sendo observados indicativos de baixa ingestão, o que foi verificado pela ausência ou redução mínima visível do volume de alimento ofertado de forma padronizada (40 μ L por indivíduo) após 4 horas de exposição, bem como pela baixa frequência de interação das abelhas com os dispositivos e pela ausência de comportamento típico de alimentação, como a extensão prolongada da probóscide (Ma *et al.*, 2016). Além disso, a posição elevada desses modelos exigia um esforço físico excessivo dos indivíduos, que precisavam se deslocar verticalmente por superfícies lisas, dificultando o alcance até o alimentador e, conseqüentemente, a alimentação.

O modelo com tampa plástica contendo xarope (D), fixado diretamente no fundo da gaiola, apresentou vazamento frequente devido à interação direta das abelhas com o dispositivo. Observou-se que os indivíduos pisavam no interior do alimentador, espalhando o xarope pelo fundo do pote, levando à contaminação interna do pote e ao desperdício do alimento.

O alimentador composto por tampa plástica com batoque bolha perfurado (E/F) apresentou desempenho superior em relação aos demais modelos testados. Embora a

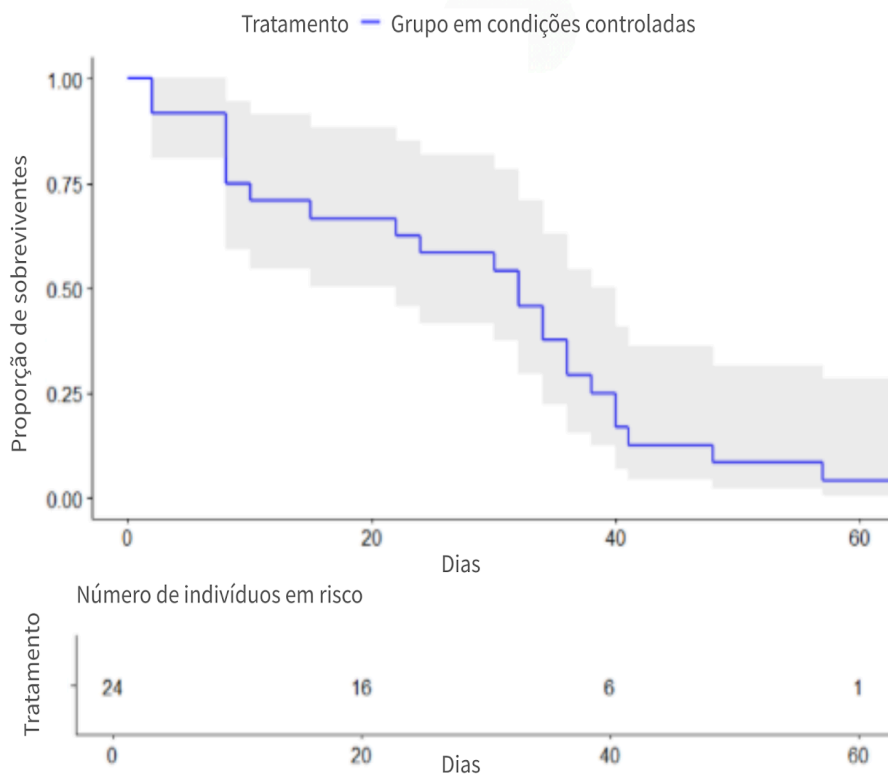
configuração com batoque instalada na lateral do pote (modelo E) tenha permitido o acesso ao alimento, sua utilização foi menos eficiente do ponto de vista prático, visto que dificultava a reposição do xarope, aumentava o risco de escorrimento interno e exigia maior manipulação das gaiolas durante a manutenção.

Já o modelo instalado no fundo do pote formato tronco de cone invertido de 1000 mL (modelo F) favoreceu o acesso eficiente ao alimento, o que foi observado pela redução do volume ofertado até sua ausência no final do período de observação de quatro horas (40 μ L), reduziu o risco de derramamento e permitiu a reposição do xarope com precisão, utilizando pipeta Pasteur, sem a necessidade de desmontar o sistema. Além disso, contribuiu para a higiene interna e facilitou o monitoramento comportamental, resultando em maior estabilidade dos indivíduos dentro da gaiola. Pela praticidade no manejo, estabilidade estrutural e eficiência no fornecimento do alimento, esse conjunto foi adotado como padrão para os experimentos subsequentes.

4.3 Teste de sobrevivência em laboratório

O tempo de sobrevivência variou entre 2 e 60 dias, com uma média de aproximadamente 30 dias e mediana de 32 dias. A curva de sobrevivência (Kaplan-Meier) demonstrou uma queda progressiva a partir do 8º dia, com mortalidade total registrada no 60º dia (Figura 7).

Figura 7. Taxa de sobrevivência de operárias de *B. morio* mantidas em condições laboratoriais controladas.



Curva de sobrevivência de operárias de *B. morio* estimada pelo método de Kaplan–Meier, em condições laboratoriais e sem exposição a agrotóxicos. A área sombreada indica o intervalo de confiança de 95%, e a tabela inferior apresenta o número de indivíduos em risco ao longo do tempo. $n = 25$. Fonte: Autoria própria, 2025.

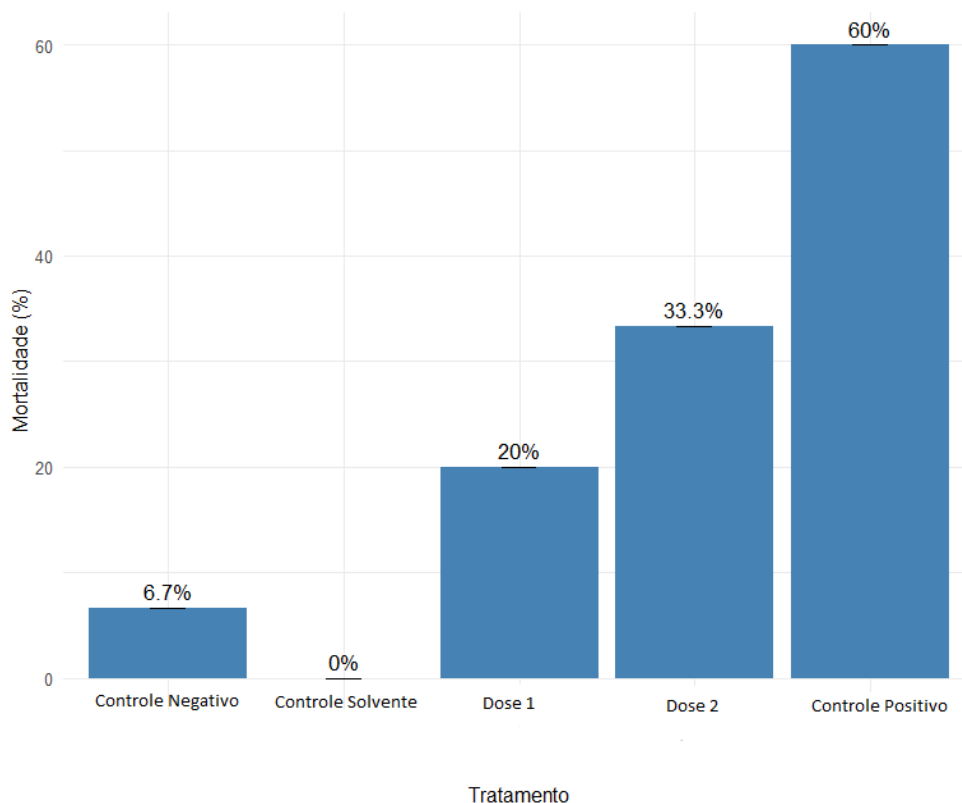
4.4 Teste de toxicidade

Os resultados indicaram que o CP (dimetoato) apresentou a maior taxa de mortalidade (60%), diferindo significativamente do CS ($p = 0,008$), evidenciando sua alta toxicidade para *B. morio*. O teste de Kruskal-Wallis indicou diferença significativa entre os tratamentos ($\chi^2 = 14$; $gl = 4$; $p = 0,007$). A análise post-hoc com o teste de Dunn (correção de Bonferroni) confirmou que apenas a comparação entre o CS e o dimetoato apresentou diferença estatística significativa (p -ajustado = 0,008).

Os tratamentos com clorantraniliprole resultaram em mortalidades de 33,3% (D2) e 20% (D1), enquanto o CN e o CS apresentaram mortalidades de 6,66% e 0%, respectivamente (Figura 8). No entanto, as doses de clorantraniliprole não diferiram

estatisticamente nem do CN nem do CS (p -ajustado $> 0,05$), indicando ausência de toxicidade significativa. A mortalidade observada no CN e no CS permaneceu dentro dos limites aceitáveis estabelecidos pelo protocolo OECD nº 247 (2017).

Figura 8. Mortalidade (%) de operárias de *B. morio* expostas a diferentes tratamentos.



CN, CS (acetona), clorantianiliprole (D1e D2) e CP (dimetoato). As barras representam a média percentual de mortalidade por grupo, e os valores sobre as barras indicam a mortalidade observada. O CP apresentou mortalidade significativamente maior em relação ao CS ($p = 0,008$). Fonte: Autoria própria, 2025.

4.5 Validação dos bioensaios

No presente estudo, ambos os tratamentos CN e CP atenderam aos critérios estabelecidos pela OECD nº 247 (2017), garantindo a validação das condições experimentais, o CP apresentou uma mortalidade média de 60% após 48h do experimento, enquanto, o CN registrou uma mortalidade média de 6,66%, após 48h do experimento.

5. DISCUSSÃO

Modelos de contenção para o gênero *Bombus* são amplamente discutidos por Klinger *et al.* (2019), que revisam o uso de microcolônias como ferramenta para avaliar efeitos subletais de pesticidas na reprodução e no desenvolvimento larval. Esses sistemas, geralmente baseados em caixas de plástico ou acrílico com compartimentos para nidificação e alimentação, são eficazes para espécies comerciais como *B. terrestris*, pois priorizam a interação social e a manutenção da prole em ambiente controlado. No entanto, tais configurações visam o comportamento de grupo em laboratório e não atendem plenamente às necessidades de adaptação individual de operárias forrageiras, como *B. morio*. O comportamento ativo de voo e a resistência ao manejo dessas operárias nativas exigiram adaptações no volume das gaiolas, visando reduzir o estresse de confinamento e garantir a viabilidade dos bioensaios.

Neste estudo, ao testar configurações inspiradas nesses protocolos clássicos para a espécie neotropical *B. morio*, foram observadas limitações significativas. O uso de seringas hipodérmicas, frequentemente recomendado na literatura (Klinger *et al.*, 2019) com base em diretrizes da USDA-ARS e EPA, se mostrou ineficiente para as operárias capturadas em campo. A abertura estreita da seringa, associada ao comportamento de busca ativa dessas forrageiras, dificultou a localização e o acesso contínuo ao xarope. Além disso, o posicionamento vertical e a superfície lisa do dispositivo comprometeram o apoio necessário para a estabilização da abelha durante a alimentação. Diferente de indivíduos de colônias comerciais, que apresentam maior adaptação a condições artificiais de criação (Velthuis; Van Doorn, 2006), as forrageiras de *B. morio* apresentaram baixa interação com esse modelo, sugerindo que ele exigia um maior esforço físico de escalada e permanência em superfícies plásticas para o alcance do alimento.

Modelos com microtubos plásticos de 2 mL, perfurados lateralmente, também não se mostraram eficientes. Embora frequentemente utilizados com espécies menores como as da tribo Meliponini (Lourenço *et al.*, 2012), esse sistema não foi compatível com *B. morio*, provavelmente devido à desproporção entre o tamanho dos orifícios e o aparelho bucal das mamangavas, cuja morfologia está diretamente associada à exploração de recursos florais e ao acesso ao néctar em diferentes estruturas (Goulson, 2010).

O reposicionamento horizontal do microtubo, apoiado sobre um cubo de madeira para promover maior estabilidade, não resultou em melhora significativa. Apesar da maior estabilidade estrutural, as abelhas não se alimentaram por meio deste sistema, sugerindo que

a limitação não estava relacionada ao posicionamento do dispositivo, mas sim ao próprio modelo do microtubo com perfurações menores. A tentativa de ampliar os furos foi descartada, pois comprometeria a vedação e provocaria vazamento de xarope, gerando contaminação e desperdício, o que inviabiliza sua aplicação em condições experimentais controladas.

Outro modelo testado consistiu em tampas plásticas instaladas diretamente no fundo do pote, contendo o xarope. Embora tenham permitido acesso direto ao alimento, esse sistema resultou em frequentes vazamentos. O deslocamento constante das abelhas sobre a tampa provocava derramamento do xarope, contaminando a superfície interna da gaiola e comprometendo tanto a higiene quanto a observação do comportamento, além de interferir na quantificação do consumo alimentar, aspecto relevante em bioensaios com abelhas (OECD, 2017).

O modelo que apresentou melhor desempenho foi o composto por pote formato tronco de cone invertido de 1000 mL com tampas plásticas contendo batoques bolha de 16,5 mm, adaptados com um furo central de aproximadamente 3,5 mm de diâmetro, compatível com o diâmetro de uma pipeta Pasteur padrão. Essa configuração possibilitou que as abelhas acessassem o alimento de forma segura, evitando contato excessivo com o xarope e mantendo os indivíduos secos e ativos, favorecendo condições mais adequadas para a ingestão controlada da dieta em ensaios toxicológicos (OECD, 2017).

O posicionamento do alimentador também influenciou a eficiência. Embora o sistema tenha sido testado em diferentes posições dentro da gaiola, o melhor desempenho foi observado quando instalado no fundo do pote, onde o acesso se deu de maneira mais frequente e natural. O formato convexo do batoque favoreceu a oferta do alimento de forma pontual e controlada, promovendo maior higiene interna e facilitando a coleta de dados comportamentais, provavelmente por direcionar o acesso ao alimento a um ponto específico, reduzindo o contato indiscriminado com a solução e favorecendo um padrão mais consistente de alimentação.

Durante a rotina experimental, os indivíduos mantidos nesse modelo apresentaram sinais comportamentais consistentes com baixo estresse, como movimentação ativa e comportamento alimentar eficiente (Ghristina *et al.*, 2020). Além disso, a transparência do pote facilitou a observação direta, sem a necessidade de manipulação constante. A limpeza do sistema também foi facilitada pelo bom acoplamento das peças e ausência de vazamentos, garantindo reprodutibilidade entre experimentos.

O protocolo OECD nº 247 (2017), que estabelece diretrizes para testes de toxicidade oral em abelhas do gênero *Bombus*, também apresenta recomendações específicas para os sistemas de contenção, adotando *B. terrestris* e *B. impatiens* como espécies-modelo. Entre as opções sugeridas estão as gaiolas Nicot®, onde cada indivíduo é mantido isoladamente em caixas com alimentadores de seringa plástica de 2 mL, com a ponta cortada para facilitar o acesso ao alimento. As gaiolas são posicionadas lado a lado, permitindo contato visual e olfativo entre os indivíduos, e levemente inclinadas para assegurar o fluxo contínuo da dieta até a abertura da seringa, garantindo o fornecimento adequado mesmo durante a exposição ao agrotóxico (OECD, 2017).

Entretanto, apesar da ampla utilização desses modelos com *B. terrestris* e *B. impatiens*, sua aplicação direta em espécies neotropicais, como *B. morio*, exige cautela. Diferenças no grau de adaptação a condições artificiais, especialmente entre indivíduos provenientes de colônias comerciais e operárias coletadas em campo, podem influenciar diretamente a adaptação ao sistema, como a capacidade de acessar o alimento e interagir com os dispositivos experimentais, bem como o bem-estar dos indivíduos (Velthuis, Van Doorn, 2006; Goulson, 2010). Assim, a padronização proposta neste estudo buscou adaptar e validar sistemas de contenção compatíveis com essas particularidades, assegurando a viabilidade dos bioensaios, a redução do estresse nos indivíduos e condições adequadas para a realização dos testes de toxicidade e comportamento, além de empregar materiais de baixo custo e fácil aquisição, favorecendo a acessibilidade do método e sua aplicação.

Nesse contexto, o desenvolvimento do modelo de pote com tampa e batoque perfurado contribui não apenas para a contenção e alimentação dos indivíduos, mas também para a padronização metodológica de ensaios toxicológicos com *Bombus* no Brasil. A ausência de protocolos adaptados para espécies nativas pode gerar variações experimentais relacionadas ao sistema de contenção e alimentação, dificultando a comparação entre estudos e a interpretação dos efeitos de diferentes ingredientes ativos. Dessa forma, a adoção de um sistema mais estável e funcional pode reduzir essas fontes de variação e contribuir para a obtenção de dados mais consistentes em ensaios ecotoxicológicos.

A adaptação do sistema de contenção permitiu a avaliação da sobrevivência de *B. morio* em condições laboratoriais controladas. A manutenção dos indivíduos por vários dias, na ausência de exposição a agrotóxicos, está de acordo com o que já foi descrito para espécies do gênero *Bombus*, nas quais a longevidade das operárias pode variar conforme a atividade desempenhada e as condições experimentais (Silva-Matos; Garófalo, 2000). Nesse contexto, a determinação da sobrevivência em condições controladas fornece um parâmetro

de referência, permitindo distinguir efeitos causados por substâncias daqueles associados às próprias condições experimentais.

O presente estudo avaliou a longevidade de operárias de *B. morio* coletadas em campo durante o forrageamento, o que indica que se tratavam de indivíduos em fase funcional avançada dentro da colônia. Segundo Goulson *et al.* (2002), embora o polietismo em *Bombus* seja menos rígido do que em abelhas melíferas, as operárias de *B. terrestris* que realizam o forrageio tendem a ser maiores do que aquelas que permanecem no ninho, sendo consideradas em fase funcional mais avançada dentro da colônia. No entanto, como tais observações foram feitas em uma espécie exótica, a extrapolação direta para espécies neotropicais, como *B. morio*, exige cautela. Deve-se considerar que, no presente estudo, foram utilizadas operárias coletadas em campo durante o forrageamento, as quais apresentam histórico de atividade, idade e condições fisiológicas desconhecidas, o que pode estar associado a uma maior variabilidade experimental, ao contrário de indivíduos provenientes de colônias comerciais, que são mantidos em condições controladas e apresentam maior homogeneidade experimental. Essas diferenças podem influenciar a resposta dos indivíduos em ensaios laboratoriais e a interpretação dos dados de longevidade.

Após a coleta, as operárias foram mantidas em condições laboratoriais controladas, com acesso exclusivo a solução açucarada (50% v/v) *ad libitum* e sem acesso ao ambiente externo. Esse protocolo de confinamento completo, sem oferta de pólen, diferencia este trabalho de outros estudos que incluem a suplementação proteica na dieta das abelhas, como os realizados por Goldblatt e Fell (1987), Silva-Matos e Garófalo (2000) e Smeets e Duchateau (2003). A ausência do fornecimento protéico possibilita uma avaliação rigorosa da capacidade fisiológica da espécie frente a restrições ambientais, especialmente quanto à longevidade e resistência ao estresse nutricional (Schmidt; Thoenes; Levin, 1987).

Garófalo (1978) relatou que operárias de *B. morio* emergidas e criadas em laboratório viveram, em média, 36,4 dias quando exerciam atividade forrageadora com acesso ao ambiente externo, e até 72,6 dias quando permaneceram exclusivamente no ninho. Em comparação, as operárias deste estudo, mesmo sob confinamento absoluto e sem fornecimento protéico, apresentaram longevidade relativamente próxima às forrageadoras do estudo clássico, indicando uma notável resiliência fisiológica da espécie ao isolamento e à restrição alimentar.

Smeets e Duchateau (2003) analisaram a longevidade de operárias de *B. terrestris* sob diferentes regimes alimentares e observaram que a privação de pólen reduzia drasticamente a sobrevivência para 13 a 15 dias, enquanto as que tinham acesso ao pólen viviam até 76 dias.

A longevidade das operárias de *B. morio* aqui estudadas, mesmo sem acesso a proteínas, foi aproximadamente o dobro do observado em *B. terrestris*, sugerindo diferenças na demanda nutricional ou na utilização de reservas fisiológicas entre as espécies, reforçando assim a necessidade de desenvolver protocolos de avaliação de toxicidade específicos para espécies nativas.

Estudos com outras espécies do gênero *Bombus*, como *B. atratus* analisado por Silva-Matos e Garófalo (2000) e *Bombus fervidus* (Fabricius, 1798) e *Bombus pennsylvanicus* (De Geer, 1773) avaliados por Goldblatt e Fell (1987), relataram longevidade menores ou similares, porém sempre considerando indivíduos com acesso ao ambiente natural e fontes proteicas. Isso reforça que o ambiente laboratorial pode mitigar alguns estresses ambientais, mesmo na ausência de uma dieta completa, o que contribui para a longevidade observada no presente estudo.

Dobes *et al.* (2020) demonstraram que o forrageamento impõe custos metabólicos e imunológicos em *B. terrestris*, reduzindo proteínas na hemolinfa e aumentando a atividade antimicrobiana como resposta ao desgaste do ambiente. No presente estudo, a manutenção das operárias em ambiente controlado evitou a exposição a patógenos e outros estressores externos, o que provavelmente reduziu a necessidade de ativação constante do sistema imunológico (Schmid-Hempel, 2005). Assim, a maior longevidade observada em *B. morio* pode estar associada à preservação das proteínas da hemolinfa e das reservas nutricionais que, em condições de campo, seriam consumidas para manutenção da resposta imunológica.

Além disso, comparações com outras espécies de abelhas revelam variações expressivas na longevidade. Em *A. mellifera*, por exemplo, operárias mantidas em laboratório sob ausência de estressores ambientais apresentam tempo de vida entre 15 e 38 dias, intervalo compatível com o observado em operárias em campo (Remolina *et al.*, 2007). No presente estudo, a sobrevivência registrada para *B. morio* foi compatível com valores descritos para outras abelhas mantidas em ambiente controlado, o que sugere que, mesmo em ambiente controlado, a longevidade das operárias é modulada por processos intrínsecos de senescência, reforçando a resiliência fisiológica observada em *B. morio*.

Essa resistência fisiológica também depende diretamente da manutenção adequada dos indivíduos durante os bioensaios, o que torna a escolha dos sistemas de contenção e alimentação um aspecto fundamental para o sucesso experimental. No presente estudo, a eficiência do sistema de contenção, composto por potes formato tronco de cone invertido de 1000 mL com tampas plásticas adaptadas e alimentadores tipo batoque bolha, mostrou-se essencial para garantir o acesso adequado ao alimento, minimizar o estresse comportamental

e facilitar a observação e limpeza. A baixa mortalidade observada no CN (6,66%) e a resposta satisfatória ao CP (60%) atenderam aos parâmetros definidos pela OECD n° 247 (2017), refletindo a robustez e confiabilidade das condições laboratoriais. Esses resultados comprovam que a padronização das gaiolas e alimentadores foi decisiva não apenas para a viabilidade dos testes, mas também para o bem-estar dos indivíduos e para a interpretação precisa dos efeitos toxicológicos.

A longevidade elevada e a integridade comportamental observadas nos grupos controle forneceram uma base sólida para a interpretação dos efeitos observados nos tratamentos. Nos grupos expostos ao clorotraniliprole, as taxas de mortalidade registradas não diferiram estatisticamente dos controles, sugerindo baixa toxicidade aguda nas condições experimentais avaliadas. Ainda assim, a maior mortalidade observada na dose mais elevada indica a necessidade de cautela, especialmente em contextos de exposição repetida ou prolongada. Esses resultados estão alinhados com estudos anteriores que reportam baixa letalidade oral do clorotraniliprole em *B. terrestris* e *A. mellifera* quando expostos a concentrações ambientalmente realistas (Dinter *et al.*, 2009; Smagghe *et al.*, 2013).

Além da mortalidade, foram observados de forma qualitativa efeitos adversos no comportamento dos indivíduos expostos ao clorotraniliprole, como paralisia, espasmos nas pernas e antenas e incapacidade de locomoção. Esses sinais são compatíveis com quadros de disfunção neuromuscular descritos para insetos expostos a esse inseticida (Haas *et al.*, 2021) e sugerem a ocorrência de efeitos subletais com potencial para comprometer tarefas essenciais, como forrageamento, retorno ao ninho e comunicação intraespecífica.

Esses efeitos já foram relatados em *A. mellifera*, onde exposições subletais ao clorotraniliprole provocaram alterações no comportamento, na capacidade locomotora e na resposta neuromuscular, mesmo na ausência de mortalidade imediata (Williams; Swale; Anderson, 2020; Li *et al.*, 2024). Assim, ainda que o ensaio atual não tenha identificado mortalidade estatisticamente elevada, os sinais comportamentais e neuromusculares observados qualitativamente em *B. morio* sugerem que o inseticida pode impactar negativamente a fisiologia dos indivíduos e, por consequência, os serviços ecossistêmicos de polinização.

Apesar desses indícios, as avaliações regulatórias de risco ainda se baseiam majoritariamente em parâmetros letais, como a DL_{50} , e no uso exclusivo de *A. mellifera* como organismo modelo, ignorando variações comportamentais, fisiológicas e ecológicas entre diferentes espécies de abelhas (Nocelli *et al.*, 2018; Loureccetti *et al.*, 2023). Como destacado por Loureccetti *et al.* (2023), abelhas nativas e de outras guildas podem responder de maneira

distinta aos agrotóxicos, e extrapolações a partir de uma única espécie não garantem proteção adequada para a diversidade de polinizadores (Arena e Sgolastra, 2014; Rundlöf *et al.*, 2015; Woodcock *et al.*, 2017).

Portanto, embora o clorantraniliprole não tenha provocado mortalidade elevada neste experimento, os efeitos comportamentais e neuromusculares observados sugerem a ocorrência de toxicidade subletal relevante. Esses achados estão em concordância com a literatura que evidencia a importância de incluir parâmetros subletais nas avaliações de risco de agrotóxicos, como alterações motoras, letargia, desorientação e outros indicadores comportamentais frequentemente não detectados em bioensaios baseados apenas na mortalidade (Arena e Sgolastra, 2014).

Além disso, este estudo evidencia uma lacuna nas abordagens ecotoxicológicas, relacionada à exclusão de espécies nativas como *B. morio* nos testes regulatórios. Diferenças fisiológicas, comportamentais e ecológicas entre *B. morio* e *A. mellifera* indicam que espécies de abelhas podem apresentar respostas distintas à exposição a agrotóxicos (Arena e Sgolastra, 2014). Nesse contexto, os efeitos neuromotores observados em *B. morio* neste estudo são consistentes com essa variabilidade interespecífica. Assim, ressalta-se a importância de incluir ensaios com múltiplas espécies de polinizadores, especialmente aquelas associadas a ecossistemas tropicais, de modo a ampliar a representatividade das avaliações de risco.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que *B. morio* é uma espécie viável para testes laboratoriais de toxicidade oral, desde que sejam adotadas adaptações metodológicas compatíveis com a variabilidade fisiológica e comportamental de operárias nativas coletadas em campo, quando comparadas a indivíduos de colônias comerciais mantidos sob condições controladas. A padronização de sistemas de contenção e alimentação foi essencial para garantir o bem-estar dos indivíduos, a consistência dos dados e a adequação experimental dos bioensaios. A validação experimental, evidenciada pela baixa mortalidade no CN e pela resposta eficaz ao CP, atendeu aos critérios internacionais estabelecidos pela OECD N° 247 (2017), confirmando a eficácia do protocolo desenvolvido neste trabalho.

Além disso, os testes de toxicidade revelaram que, embora o clorantraniliprole não tenha induzido mortalidade estatisticamente significativa, foram observados, de forma qualitativa, sinais comportamentais compatíveis com possíveis efeitos subletais

neuromusculares. Esses achados sugerem a importância de considerar parâmetros comportamentais e fisiológicos nas avaliações de risco, para além da letalidade.

Por fim, este trabalho reforça a necessidade urgente de ampliar os testes ecotoxicológicos para espécies de abelhas nativas, como *B. morio*, cuja sensibilidade pode não ser representada adequadamente por espécies exóticas, ainda que do mesmo gênero, utilizadas em protocolos regulatórios. A inclusão de uma diversidade de espécies nos ensaios toxicológicos é fundamental para a construção de políticas mais protetivas e eficazes voltadas à conservação dos polinizadores e à segurança ambiental.

7. REFERÊNCIAS

- A.B.E.L.H.A. – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDOS DAS ABELHAS. **Produção agrícola**. São Paulo: A.B.E.L.H.A., 2020. Disponível em: <https://abelha.org.br/polinizacao-producao-agricola/>. Acesso em: 3 jul. 2025.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, DF: MAPA, 2019. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.
- ARENA, M.; SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 324–334, abr. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1230-4>.
- CECCHETTO, F. *et al.* Occurrence of chlorpyrifos and organochlorine pesticides in a native bumblebee (*Bombus pauloensis*) living under different land uses in the southeastern Pampas, Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 905, p. 167117, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167117>.
- COOLEY, H.; VALLEJO-MARÍN, M. Buzz-pollinated crops: a global review and meta-analysis of the effects of supplemental bee pollination in tomato. **Journal of Economic Entomology**, v. 114, n. 2, p. 505–519, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/toab009>. Acesso em: 25 jun. 2025.
- CÓRDOVA, D. *et al.* Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 3, p. 196–214, mar. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>.
- COSTA, L. F.; PIRES, G. L. P. Análise histórica sobre a agricultura e o advento do uso de agrotóxicos no Brasil. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – TOLEDO PRUDENTE CENTRO UNIVERSITÁRIO, 12., 2016, Presidente Prudente. **Anais [...]**. Presidente Prudente: Toledo Prudente, 2016.
- DINTER, A. *et al.* Chlorantraniliprole (Rynaxypyr): a novel DuPont™ insecticide with low toxicity and low risk for honey bees (*Apis mellifera*) and bumble bees (*Bombus terrestris*) providing excellent tools for uses in integrated pest management. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 423, p. 84–96, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5073/jka.2009.423.012>.
- DOBĚŠ, P. *et al.* The effect of foraging on bumble bees, *Bombus terrestris*, reared under laboratory conditions. **Insects**, v. 11, n. 5, art. 321, maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects11050321>.
- FRANCO, C. R.; PELAEZ, V. A. A (des)construção da agenda política de controle dos agrotóxicos no Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 19, n. 3, p. 215–232, set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-4422ASOC150125V1932016>.
- FRANÇOSO, E. A. **Filogeografia de *Bombus morio* e *B. pauloensis* (Hymenoptera: Apidae)**. 2015. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. Disponível em:

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41131/tde-22052015-101014/>. Acesso em: 30 jun. 2025.

FRANÇOSO, E. *et al.* Comparative phylogeography in the Atlantic forest and Brazilian savannas: pleistocene fluctuations and dispersal shape spatial patterns in two bumblebees. **BMC Evolutionary Biology**, v. 16, art. 267, dez. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0831-2>. Acesso em: 22 abr. 2026.

FRANÇOSO, E.; OLIVEIRA, F. F.; ARIAS, M. C. An integrative approach identifies a new species of bumblebee (Hymenoptera: Apidae: Bombini) from northeastern Brazil. **Apidologie**, v. 47, n. 2, p. 171–185, mar. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0385-7>.

GARÓFALO, C. A. Bionomics of *Bombus (Fervidobombus) morio*: body size and length of life of workers. **Journal of Apicultural Research**, v. 17, n. 2, p. 130–145, jun. 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.1978.11099914>.

GHRISTINA, A. *et al.* The effect of foraging on bumble bees, *Bombus terrestris*, reared under laboratory conditions. **Insects**, v. 11, n. 5, art. 321, maio 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7290516/>. Acesso em: 21 jul. 2025.

GOLDBLATT, L. A.; FELL, R. D. Adult longevity of workers of the bumble bees *Bombus fervidus* and *Bombus pennsylvanicus*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 65, n. 10, p. 2343–2346, out. 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/z87-353>.

GOULSON, D. **Bumblebees: behaviour, ecology and conservation**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2010.

GOULSON, D. *et al.* Can alloethism in workers of the bumblebee, *Bombus terrestris*, be explained in terms of foraging efficiency? **Animal Behaviour**, v. 64, n. 1, p. 123–130, jul. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.3041>.

HAAS, J. *et al.* A mechanism-based approach unveils metabolic routes potentially mediating chlorantraniliprole synergism in honey bees, *Apis mellifera* L., by azole fungicides. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, p. 965–973, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.6706>.

IPBES – INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES. **The assessment report on pollinators, pollination and food production**. Bonn: IPBES Secretariat, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca8908en>.

KLINGER, E. G. *et al.* *Bombus* (Hymenoptera: Apidae) microcolonies as a tool for biological understanding and pesticide risk assessment. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 6, p. 1249–1259, dez. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ee/nvz121>.

LI, W. *et al.* Impact of chlorantraniliprole on honey bees: differential sensitivity and biological responses in *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Science of the Total Environment**, v. 921, art. 177417, abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.177417>.

LOURENCETTI, A. P. S. *et al.* Surrogate species in pesticide risk assessments: toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, art. 120842, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120842>. Acesso em: 30 jun. 2025.

LOURENÇO, C. T. *et al.* Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 921–924, out. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0784-2>.

MA, C. *et al.* A novel behavioral assay to investigate gustatory responses of individual, freely-moving bumble bees (*Bombus terrestris*). **Journal of Visualized Experiments**, n. 113, e54233, jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/54233>.

MALASPINA, O. *et al.* **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil**. São Paulo: Instituto Biotrópicos, 2010. 64 p. Disponível em: <https://pt.scribd.com/document/139255011/Efeitos-Dos-Agrotoxicos-Sobre-as-Abelhas-Silvestres-Brasil>. Acesso em: 1 jul. 2025.

NOCELLI, R. C. F. *et al.* **Riscos de pesticidas sobre as abelhas**. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2025.

NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. **Protocolo para testes de toxicidade de substâncias químicas em abelhas sem ferrão**: teste de toxicidade por contato. Rio Claro: UNESP, [2025]. Em elaboração. Acesso em: 4 fev. 2025.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test no. 247: Bumblebee, acute oral toxicity test**. Paris: OECD, 2017. Disponível em: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-no-247-bumblebee-acute-oral-toxicity-test-9789264284128-en.htm>. Acesso em: 11 out. 2023.

PATRÍCIO, G. B. **A influência da qualidade dos habitats sobre os polinizadores de berinjela e a produtividade dos cultivos**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013. Disponível em: <https://hdl.handle.net/11449/100657>.

POTTS, S. G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Version 4.3.3. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 30 jun. 2025.

RIBEIRO, L. A. O. *et al.* Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil (2009–2019): riscos, benefícios e alternativas. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 189–203, abr./jun. 2022. Disponível em: <https://revistabrasileirademeioambiente.com/index.php/RVBMA/article/view/1025>.

REMOLINA, S. C. *et al.* Senescence in the worker honey bee *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 10, p. 1027–1033, out. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.05.015>.

RUNDLÖF, M. *et al.* Seed coating with a neonicotinoid insecticide negatively affects wild bees. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 77–80, maio 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14420>.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **CIIAGRO Online: Monitoramento Agrometeorológico**. Campinas: IAC, 2025. Disponível em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br>. Acesso em: 9 abr. 2026.

SCHMIDT, J. O.; THOENES, S. C.; LEVIN, M. D. Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 1, p. 176–183, jan. 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aesa/80.2.176>.

SCHMID-HEMPEL, P. Evolutionary ecology of insect immune defenses. **Annual Review of Entomology**, v. 50, p. 529–551, jan. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130420>.

SILVA-MATOS, E. V.; GARÓFALO, C. A. Worker life tables, survivorship, and longevity in colonies of *Bombus (Fervidobombus) atratus* (Hymenoptera: Apidae). **Revista de Biología Tropical**, v. 48, n. 2–3, p. 491–502, jun./set. 2000. Disponível em: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442000000200038&script=sci_arttext. Acesso em: 22 jul. 2025.

SMAGGHE, G. *et al.* Dietary chlorantraniliprole suppresses reproduction in worker bumblebees. **Pest Management Science**, v. 69, n. 7, p. 787–791, jul. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.3504>.

SMEETS, M. A. J.; DUCHATEAU, M. J. Longevity of *Bombus terrestris* workers in relation to pollen availability, in the absence of foraging. **Apidologie**, v. 34, n. 4, p. 399–408, jul./ago. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/apido:2003038>.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. **Agrotóxicos no Brasil**. Jaguariúna: Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/qualidade/dinamica/agrotoxicos-no-brasil>. Acesso em: 4 out. 2024.

VELTHUIS, H. H. W.; VAN DOORN, A. A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. **Apidologie**, v. 37, n. 4, p. 421–451, jul./ago. 2006. Disponível em: <https://bit.ly/3VelthuisBombus>. Acesso em: 13 abr. 2026.

WILLIAMS, J. R.; SWALE, D. R.; ANDERSON, T. D. Comparative effects of technical-grade and formulated chlorantraniliprole to the survivorship and locomotor activity of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2582–2588, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5832>.

WOODCOCK, B. A. *et al.* Country-specific effects of neonicotinoid pesticides on honey bees and wild bees. **Science**, v. 356, n. 6345, p. 1393–1395, jun. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aaa1190>.

ZATTARA, E. E.; AIZEN, M. A. Worldwide occurrence records suggest a global decline in bee species richness. **One Earth**, v. 4, n. 1, p. 114–123, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2020.12.005>.

CAPÍTULO 3

Análise histológica e comportamental dos efeitos subletais do clorantraniliprole em *Bombus morio* (Swederus, 1787).

RESUMO

A intensificação do uso de agrotóxicos na agricultura tem levantado preocupações quanto aos efeitos subletais sobre abelhas, especialmente espécies nativas pouco contempladas em avaliações de risco. Nesse contexto, este estudo avaliou os efeitos da exposição oral ao clorantraniliprole em operárias de *Bombus morio*, integrando análises histológicas e comportamentais. As abelhas foram expostas por 48 horas a duas concentrações do inseticida (1,3 µg/mL e 2,58 µg/mL), incluindo controles negativo e solvente. Após a exposição, foram realizadas análises histológicas do intestino médio, túbulos de Malpighi e musculatura de voo, além da avaliação de parâmetros locomotores. Os resultados evidenciaram alterações morfofisiológicas dose-dependentes. No intestino médio, foi observada desorganização epitelial, aumento da eliminação celular, redução da borda em escova e comprometimento dos ninhos regenerativos. Nos túbulos de Malpighi, foram registradas perda de material citoplasmático, alterações nucleares e perda da integridade epitelial. A musculatura de voo apresentou desorganização das fibras, perda das estriações e formação de lacunas interfibrilares. Por outro lado, não foram detectadas alterações nos parâmetros comportamentais avaliados após o período de exposição. De forma geral, os resultados demonstram que, embora não haja comprometimento comportamental detectável no curto prazo, a exposição ao clorantraniliprole promove alterações estruturais significativas em órgãos fundamentais, evidenciando efeitos subletais relevantes. Esses achados reforçam a importância da inclusão de análises morfofisiológicas em estudos ecotoxicológicos e destacam o potencial do uso de espécies nativas como *B. morio* para avaliações de risco ambiental mais representativas.

Palavras-chave: abelhas nativas, toxicidade subletal, intestino médio, túbulos de Malpighi, musculatura de voo, mamangava, inseticida.

ABSTRACT:

The increasing use of pesticides in agriculture has raised concerns regarding their sublethal effects on bees, particularly native species that are often underrepresented in risk assessment studies. In this context, this study evaluated the effects of oral exposure to chlorantraniliprole in worker bees of *Bombus morio*, integrating histological and behavioral analyses. Bees were exposed for 48 hours to two insecticide concentrations (1.3 µg/mL and 2.58 µg/mL), including negative and solvent controls. After exposure, histological analyses were performed on the midgut, Malpighian tubules, and flight muscle, in addition to the assessment of locomotor parameters. The results revealed dose-dependent morphophysiological alterations. In the midgut, epithelial disorganization, increased cellular shedding, reduction of the brush border, and impairment of regenerative nests were observed. In the Malpighian tubules, cytoplasmic loss, nuclear alterations, and disruption of epithelial integrity were recorded. The flight muscle exhibited fiber disorganization, loss of striations, and formation of inter-fibrillar lacunae. Conversely, no changes were detected in the behavioral parameters evaluated after the exposure period. Overall, the results demonstrate that, although no detectable short-term behavioral impairment occurred, exposure to chlorantraniliprole induces significant structural alterations in key organs, evidencing relevant sublethal effects. These findings reinforce the importance of including morphophysiological analyses in ecotoxicological studies and highlight the potential use of native species such as *B. morio* for more representative environmental risk assessments.

Keywords: native bees, sublethal toxicity, midgut, Malpighian tubules, flight muscles, bumblebee, insecticide.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas desempenham um papel essencial nos ecossistemas terrestres, sendo consideradas os polinizadores mais eficientes da flora silvestre e de diversas culturas agrícolas. O sucesso da polinização está diretamente relacionado às características morfológicas, fisiológicas e comportamentais desses insetos (IPBES, 2016; Potts *et al.*, 2010).

Entretanto, ao longo dos últimos anos, tem-se observado uma queda acentuada nas populações de abelhas em diferentes partes do mundo, o que preocupa pesquisadores e autoridades, já que compromete diretamente os serviços de polinização, processo essencial à manutenção dos ecossistemas e da produção agrícola, além de garantir a segurança alimentar global (Beringer; Maciel; Tramontina, 2019). Diversos fatores são apontados como causas desse declínio, incluindo alterações climáticas, infecções por patógenos, destruição de habitats naturais e, com destaque, o uso frequente e intensivo de agrotóxicos (IPBES, 2016). Essas substâncias são amplamente utilizadas na agricultura por contribuírem com o controle de pragas e doenças, evitando perdas na produtividade agrícola a curto prazo. No entanto, seu uso intensivo e, muitas vezes, inadequado, pode acarretar efeitos adversos à saúde humana e ao equilíbrio dos ecossistemas, pois os efeitos atingem outros organismos não-alvo e benéficos para a agricultura (Franco; Pelaez, 2016; Costa; Pires, 2016; Ribeiro *et al.*, 2022).

O clorantraniliprole, um dos agrotóxicos amplamente empregados no campo, especialmente no Brasil, onde seu registro e uso se consolidaram a partir da década de 2010 (Brasil, 2021), pertence à classe das diamidas antranílicas. Esse agrotóxico atua sobre os receptores de rianodina (RyR), canais que regulam a liberação de íons cálcio (Ca^{2+}), fundamentais para o processo de contração muscular. Sua ação induz a liberação descontrolada do Ca^{2+} armazenado no interior das células, resultando em um desequilíbrio da homeostase celular, interferindo em processos fundamentais como contração muscular, secreção hormonal e reparo celular (Córdova, 2006; Lahm; Córdoba; Barry, 2009; Collet *et al.*, 2021). A exposição a esse agrotóxico pode causar paralisia, letargia, interrupção alimentar e regurgitação, levando, muitas vezes, à morte do inseto (Haas *et al.*, 2021).

No Brasil, o clorantraniliprole é registrado para aplicação em mais de 17 culturas agrícolas, muitas das quais apresentam intensa oferta de recursos florais atrativos para polinizadores (Brasil, 2019). Apesar de ser considerado pouco tóxico para mamíferos, esse composto apresenta alta seletividade para insetos, sendo classificado como "muito perigoso

ao meio ambiente" (classe II), conforme a Portaria Ibama nº 84/1996. Essa classificação reforça a necessidade de maior atenção quanto aos impactos ambientais do seu uso.

Além disso, trata-se de um inseticida sistêmico, com capacidade de translocar pelos tecidos vegetais após a aplicação. Assim, o agrotóxico pode se acumular em estruturas como folhas, caule, néctar e pólen, possibilitando a exposição de polinizadores ao longo de todo o período de floração (Dively; Kamel, 2012). Essa propriedade amplia a janela de risco para organismos não-alvo, como as abelhas, que entram em contato com resíduos do produto ao visitarem flores contaminadas, sendo assim continuamente expostas ao clorantraniliprole ao consumirem esses recursos (Goulson, 2013).

Quando as abelhas ingerem alimentos contaminados, o primeiro órgão que pode ser afetado pelo agrotóxico é o intestino médio, que desempenha papel central na digestão e na absorção de nutrientes, bem como na entrada de substâncias tóxicas no organismo (Cruz-Landim; Silva-de-Moraes; Serrão, 1996; Denecke *et al.*, 2018; Caccia *et al.*, 2019). O trato digestivo das abelhas, descrito originalmente para *A. mellifera* por Snodgrass (1956), é constituído por três segmentos principais: intestino anterior, médio e posterior. O intestino médio, também conhecido como ventrículo, é responsável pela maior parte da digestão enzimática e pela absorção dos nutrientes, razão pela qual é frequentemente chamado de "estômago funcional" dos insetos (Snodgrass, 1956; Cruz-Landim, 2009; Rossi *et al.*, 2013).

O epitélio do intestino médio é formado por três tipos celulares: (i) células digestivas (ou enterócitos), que são majoritárias e exercem a função de produzir enzimas digestivas, formar a membrana peritrófica e absorver nutrientes; (ii) células endócrinas, responsáveis pela secreção de hormônios que regulam a fisiologia intestinal; e (iii) células regenerativas, que renovam o epitélio substituindo células senescentes (Cruz-Landim; Silva-de-Moraes; Serrão, 1996; Gonçalves *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2019). Na superfície apical dessas células, encontra-se uma borda em escova composta por microvilosidades, cuja função é ampliar a área de absorção. A membrana peritrófica recobre essa borda, atuando como barreira protetora contra danos mecânicos e agentes patogênicos, além de controlar o trânsito de substâncias entre o lúmen intestinal e o epitélio (Cruz-Landim, 2009; Malaspina; Silva-Zacarin, 2006).

Após a absorção pelo intestino médio, o agrotóxico pode ser transportado pela hemolinfa, alcançando diferentes órgãos, incluindo os túbulos de Malpighi, que constituem o principal sistema excretor e de desintoxicação dos insetos, desempenhando papel central na eliminação de xenobióticos e metabólitos tóxicos da hemolinfa. Esses órgãos excretores são constituídos por túbulos longos, finos e numerosos que flutuam na cavidade corporal,

facilitando a filtração da hemolinfa. Sua parede é composta por células especializadas que promovem a regulação osmótica e a eliminação de resíduos metabólicos e xenobióticos (Cruz-Landim, 2009; Farder-Gomes *et al.*, 2021). A superfície apical dessas células apresenta microvilosidades que ampliam a área de contato com o lúmen, aumentando a absorção de água e íons, enquanto a região basal possui invaginações que facilitam a absorção desses elementos da hemolinfa para as células do túbulo (Bradley, 1985).

Finalmente, parte do agrotóxico presente na hemolinfa pode alcançar a musculatura de voo, órgão fundamental para o deslocamento e forrageamento. Essa musculatura é altamente especializada e apresenta elevado consumo energético, sendo composta predominantemente por músculo estriado visceral, caracterizado por fibras musculares multinucleadas e com organização sarcomérica bem definida. Essas fibras são longas, cilíndricas, e organizadas em feixes, revestidas por uma lâmina basal e associadas a tecido conjuntivo. Os miócitos apresentam grande quantidade de mitocôndrias, refletindo a alta taxa metabólica necessária para sustentar o voo, além de retículo sarcoplasmático bem desenvolvido para o armazenamento e liberação de íons cálcio, fundamentais na contração muscular (Cruz-Landim, 2009). Assim, disfunções induzidas pelo clorotraniliprole, como a liberação descontrolada de íons cálcio nos miócitos, decorrente de sua atuação nos receptores de rianodina, pode comprometer o desempenho de voo, prejudicando atividades essenciais como o forrageamento e o retorno à colônia (Fernandez; Cruz-Landim; Malaspina, 2012; Gomes *et al.*, 2020).

Apesar dos avanços nas diretrizes para avaliação da toxicidade de agrotóxicos, a maior parte das normativas ainda se baseia em testes de letalidade, como a dose letal média (DL₅₀), negligenciando efeitos subletais que, embora não causem morte imediata, podem comprometer diversas funções fisiológicas e comportamentais das abelhas (Fisher, A. *et al.*, 2023), causando prejuízos para a colônia e, conseqüentemente para os serviços ecossistêmicos prestados por esses insetos. A abordagem tradicional dificulta a detecção de impactos que afetam diretamente o desempenho ecológico das espécies, como a capacidade de forrageamento, orientação, termorregulação, longevidade e reprodução (Nocelli *et al.*, 2018). Nesse sentido, torna-se essencial incluir avaliações morfofisiológicas e comportamentais que permitam investigar alterações em estruturas internas sensíveis à exposição química prolongada ou em doses subletais.

Além disso, a maioria dos estudos ecotoxicológicos ainda utiliza *A. mellifera* como organismo-modelo (Williams; Swale; Anderson, 2020; Haas *et al.*, 2021). Embora amplamente estudada e de fácil manejo em laboratório, *A. mellifera* não representa

adequadamente a diversidade morfológica, fisiológica e comportamental encontrada entre os diferentes táxons de abelhas, que pode influenciar significativamente suas respostas aos agrotóxicos (Oga; Camargo; Batistuzzo, 2008; Lourencetti *et al.* 2023).

No Brasil, avanços importantes já foram feitos com espécies nativas sem ferrão (Meliponini), que possuem características biológicas e ecológicas distintas e têm demonstrado respostas específicas a agrotóxicos, evidenciando a necessidade de ampliar os estudos para além de *A. mellifera* (Farder-Gomes *et al.*, 2024; Lourencetti *et al.* 2023). Além disso, a OECD nº 247 (2017) disponibiliza um protocolo padronizado para testes com *B. terrestris* e *B. impatiens*, representando outra guilda funcional de abelhas sociais de diferentes linhagens taxonômicas, com características fisiológicas e comportamentais distintas. Assim, considerando as evidências de que os efeitos observados em *A. mellifera* não podem ser generalizados para abelhas sem ferrão, torna-se igualmente essencial investigar outras espécies, como *B. morio*, uma espécie nativa do Brasil com ampla distribuição, para garantir avaliações de risco mais realistas e representativas dos ecossistemas locais.

Considerando esse contexto, a ampliação dos estudos toxicológicos para incluir abelhas nativas, como *B. morio*, é fundamental. Essa espécie, amplamente distribuída na América do Sul, desempenha papel relevante na polinização tanto de plantas silvestres quanto agrícolas (Cecchetto *et al.*, 2023). O gênero *Bombus* é particularmente eficiente na polinização de flores com morfologia complexa, utilizando um comportamento conhecido como polinização por vibração (*buzz pollination*), no qual as abelhas vibram a musculatura torácica para liberar o pólen das anteras. Essa forma especializada de polinização é crucial para diversas culturas que dependem de estímulos mecânicos para a liberação do pólen, sendo realizada apenas por espécies com essa capacidade comportamental e fisiológica (Patrício-Roberto *et al.*, 2012).

Dessa forma, o objetivo do presente capítulo foi avaliar os efeitos subletais da exposição oral ao clorantraniliprole em *B. morio*, integrando análises histológicas de órgãos internos, como o intestino médio, os túbulos de Malpighi e a musculatura de vôo, com a análise de parâmetros comportamentais. A compreensão desses efeitos em nível celular contribui para uma avaliação mais abrangente dos impactos desse agrotóxico sobre a saúde de abelhas nativas, além de subsidiar o desenvolvimento de estratégias mais seguras e sustentáveis no uso de agrotóxicos na agricultura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e manutenção dos indivíduos

Abelhas operárias de *B. morio* foram capturadas por meio de coleta ativa no campus da Universidade Federal de São Carlos - Araras (SP), Brasil (22°18'47.46" S, 47°22'47.85" W). As coletas foram realizadas entre fevereiro e maio de 2025, abrangendo os períodos da manhã (09:00 às 12:00 h) e final da tarde (após as 16:00 h). Durante o período amostral, as temperaturas médias mensais na região variaram de 25,5°C (fevereiro) a 19,5°C (maio), com picos térmicos de até 32°C nos horários de maior incidência solar (São Paulo, 2025). Os métodos de captura, transporte, aclimatação e manutenção dos indivíduos foram conduzidos conforme descrito no Capítulo 2 (Seções 2.2; 2.3; 2.4), seguindo o protocolo adaptado da OECD nº 247 (2017).

2.2 Exposição ao agrotóxico

A exposição oral ao clorantianiliprole foi realizada conforme os métodos detalhados no capítulo 2 (Seção 2.6), utilizando as mesmas concentrações, Dose 1 (D1; solução de sacarose a 50% + 1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e Dose 2 (D2; solução de sacarose a 50% + 2,58 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), grupo controle negativo (CN; solução de sacarose a 50%). E também foi incluído o controle solvente (CS; solução de sacarose a 50% + acetona, 0,258% (v/v)), a fim de assegurar que a acetona não interferisse nas alterações morfológicas observadas.

No presente capítulo, o objetivo foi investigar possíveis efeitos subletais do agrotóxico sobre a morfologia dos órgãos internos, não tendo como foco a avaliação de mortalidade. Dessa forma, o grupo controle positivo (CP; dimetoato), utilizado anteriormente para validação do protocolo de toxicidade conforme a OECD nº 247 (2017), não foi incluído nesta etapa, uma vez que sua função estava restrita à confirmação da resposta letal do sistema experimental.

Os mesmos indivíduos utilizados no teste de toxicidade (capítulo 2) foram mantidos por 48 horas após a exposição, período no qual foram monitorados quanto à sobrevivência e comportamento. Ao final desse período, os indivíduos sobreviventes foram destinados à análise histológica.

2.3 Análise histológica

Para a análise histológica de *B. morio* expostas ao clorantraniliprole, foram utilizados cinco indivíduos por grupo experimental. Os espécimes foram anestesiados por resfriamento em freezer a -18 °C durante 5 minutos, tempo definido com base em testes preliminares que asseguraram imobilização eficaz sem causar danos estruturais aparentes ou a morte dos indivíduos.

A dissecação foi realizada sob estereomicroscópio (Leica EZ4 HD), com remoção cuidadosa do intestino médio, dos túbulos de Malpighi e da musculatura de voo. Os órgãos foram transferidos para tubos contendo solução fixadora composta por paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 M, pH 7,4, permanecendo em fixação por 24 horas a 4 °C (Silva-Zacarin *et al.*, 2012; Toppa *et al.*, 2021). Após esse período, os tecidos foram lavados no mesmo tampão e submetidos à desidratação lenta em série crescente de etanol (15%, 30%, 50%, 70% 12h, 85%, 90%, 95% e 100%), com trocas a cada duas horas e duas trocas no etanol absoluto, conforme protocolo descrito por Silva-Zacarin *et al.* (2012).

Os tecidos foram embebidos em historesina líquida Leica® por cinco dias a 10 °C e, em seguida, emblocados em moldes com historesina de inclusão. Após a polimerização, os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo (Leica RM2255), com espessura de 3 µm. Para a etapa de corte e coloração histológica, foram selecionados três indivíduos por grupo experimental (Silva-Zacarin *et al.* 2012).

As lâminas confeccionadas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), conforme protocolo de Junqueira e Carneiro (2013), para análise morfológica dos tecidos. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas e montadas com meio permanente DPX (Distrene Plasticiser Xylene). As análises histológicas foram conduzidas em microscópio de luz Leica DM4000 B LED, e as imagens capturadas com auxílio do software DP Controller (Leica Microsystems®).

2.4. Análise comportamental

A avaliação comportamental foi conduzida sob as mesmas condições experimentais descritas para os ensaios de exposição oral ao clorantraniliprole (Seção 2.2), mantendo-se as concentrações testadas e o delineamento experimental previamente estabelecido. A análise comportamental foi baseada nos protocolos descritos por Farder-Gomes *et al.* (2021) e Farder-Gomes *et al.* (2024), com adaptações para a espécie *B. morio*, incluindo a avaliação de

indivíduos isolados em arenas individuais, em substituição ao delineamento baseado em grupos de operárias, além do ajuste do sistema de contenção.

Após o período de exposição, os indivíduos sobreviventes foram mantidos sob observação e, ao final de 48 horas, cada indivíduo foi transferido para arenas experimentais individuais constituídas por placas de Petri de 15 cm de diâmetro, utilizando-se a tampa para impedir a fuga das abelhas. Esse delineamento resultou em cinco indivíduos por tratamento, totalizando 20 abelhas avaliadas.

As arenas experimentais foram posicionadas no interior de uma caixa escura, equipada com iluminação vermelha, a fim de minimizar interferências visuais durante os registros comportamentais. Durante todo o período de gravação, a temperatura foi mantida sob controle no ambiente da sala por meio do uso de ar-condicionado, e a umidade relativa do ar foi mantida com auxílio de um umidificador de ar posicionado próximo à caixa experimental, assegurando variações máximas de 25 ± 2 °C para a temperatura e $60\% \pm 10\%$ para a umidade relativa.

Os registros comportamentais foram realizados por meio de gravações em vídeo com resolução de 1080p (Full HD), durante um período total de 15 minutos por indivíduo, utilizando um smartphone. Para a padronização das análises, foram considerados apenas os 10 minutos finais de cada gravação.

Os vídeos obtidos foram processados utilizando-se o software Ethoflow®, permitindo a extração automática dos parâmetros comportamentais. As variáveis analisadas compreenderam: distância total percorrida (cm), velocidade média (cm/s), grau de sinuosidade da trajetória (meandering) e número de paradas (episódios de inatividade definidos por um limiar mínimo de velocidade) (Farder-Gomes *et al.*, 2021; Farder-Gomes *et al.*, 2022).

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram conduzidas no ambiente R, versão 4.5.2 (R Core Team, 2025). A análise quantitativa foi aplicada às variáveis histológicas avaliadas no intestino médio e nos túbulos de Malpighi de *B. morio*, obtidas a partir de medições diretas em cortes histológicos. Foram analisados quatro tratamentos, com quatro indivíduos por tratamento, sendo cada indivíduo considerado uma unidade experimental, representada por uma lâmina histológica contendo cortes do tecido. Para cada lâmina, foram obtidas cinco imagens de cortes histológicos selecionados de forma aleatória, totalizando 20 imagens por

tratamento. As medições morfológicas foram realizadas diretamente nas imagens digitais dos cortes histológicos. A definição dos parâmetros analisados foi baseada na abordagem proposta por Grella *et al.* (2019), que descrevem indicadores morfológicos sensíveis para a detecção de alterações histológicas em tecidos de abelhas expostas a agrotóxicos.

As variáveis analisadas incluíram presença de núcleos picnóticos, vacuolização citoplasmática, células com halo perinuclear, eliminação celular para o lúmen, borda em escova e secreção apócrina. A variável “ninhos regenerativos” foi avaliada exclusivamente no intestino médio, uma vez que esse parâmetro não se aplica à morfologia dos túbulos de Malpighi.

As avaliações morfométricas foram realizadas a partir de imagens digitalizadas dos cortes histológicos, utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health – NIH, EUA), permitindo a quantificação padronizada das estruturas avaliadas. Os dados foram expressos como porcentagem, calculada a partir da razão entre o número de eventos observados e o total de células avaliadas por imagem.

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk. Diante da ausência de distribuição normal para a maioria das variáveis, foram utilizados testes estatísticos não paramétricos para a comparação entre os grupos experimentais. Quando identificadas diferenças significativas, foi aplicado o teste pós-hoc de Dunn, com correção de Bonferroni.

Para a musculatura de voo, não foi realizada análise estatística quantitativa, uma vez que esse tecido ainda necessita de parâmetros histológicos padronizados que permitam a definição de variáveis morfométricas comparáveis, especialmente para o gênero *Bombus*. Assim, a avaliação da musculatura foi conduzida de forma qualitativa, com base na identificação de alterações estruturais evidentes e biologicamente relevantes, conforme descrito nos resultados.

As análises estatísticas dos dados comportamentais também foram realizadas no R, adotando-se nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais: velocidade média, distância total percorrida, movimento sinuoso (*meandering*) e número de paradas. A normalidade dos dados comportamentais foi confirmada pelo teste de Shapiro–Wilk, permitindo a aplicação da análise de variância (ANOVA) para a comparação entre os tratamentos.

4. RESULTADOS

4.1 Intestino Médio

Nas abelhas do grupo controle negativo (CN), o epitélio do intestino médio apresentou-se organizado, com vilosidades bem delineadas e alongadas (Figura 1A). As células epiteliais estavam dispostas de forma coesa, com núcleos visíveis, arredondados a ovais. A frequência de núcleos picnóticos foi mínima, mantendo-se próxima a zero (Figura 3A). Foram observados ninhos de células regenerativas localizados na região basal do epitélio, sem indícios de dano estrutural (Figura 2A; Figura 3C). A eliminação celular para o lúmen ocorreu de baixa frequência, com baixos valores percentuais em relação aos grupos tratados (Figura 3E), sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo CS ($p > 0,05$). A borda em escova apresentou altura preservada e distribuição homogênea (Figura 3F), sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), e não foram observadas alterações relevantes na secreção apócrina (Figura 3G).

As abelhas do grupo controle solvente (CS) apresentaram padrão histológico do intestino médio semelhante ao observado no controle negativo, não sendo identificadas alterações morfológicas associadas à presença de acetona na concentração utilizada (Figura 1B). A porcentagem de núcleos picnóticos permaneceu baixa e comparável ao controle (Figura 3A), sem diferença estatisticamente significativa, assim como a eliminação celular e a ocorrência de halo perinuclear (Figura 3E; Figura 3D), ($p > 0,05$). Os ninhos de células regenerativas mantiveram-se íntegros e organizados (Figura 3C), sem diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), e a altura da borda em escova se manteve preservada, apresentando valores semelhantes aos observados no grupo controle negativo (Figura 2B; Figura 3F).

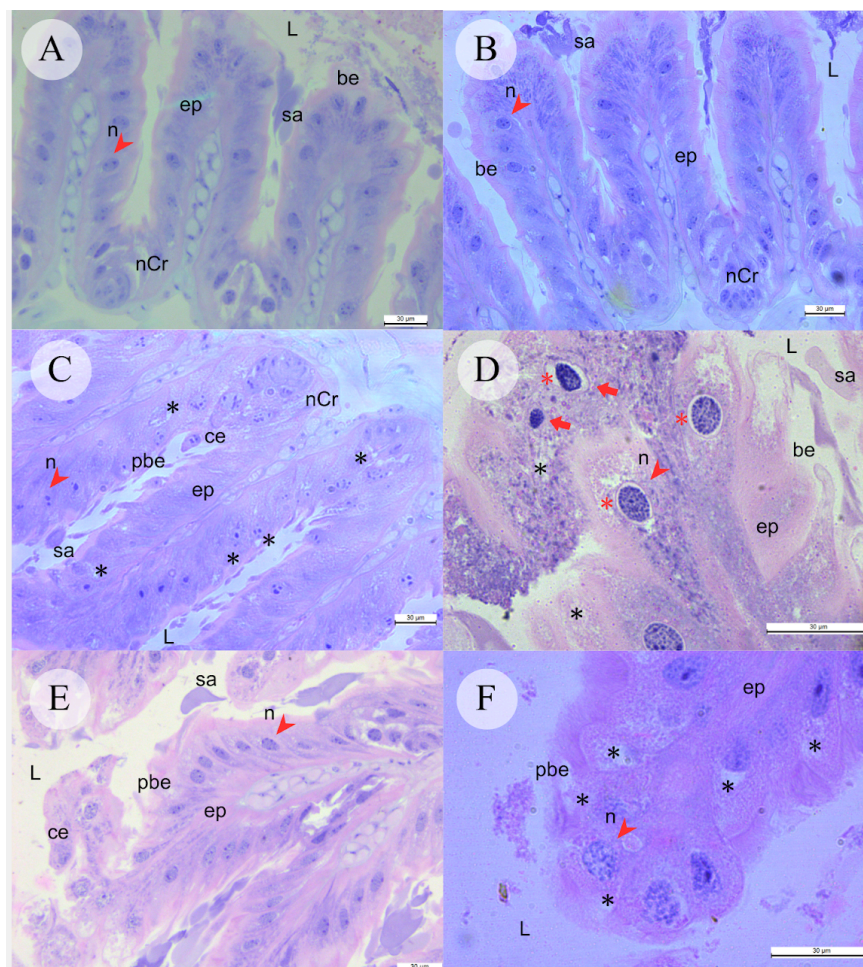
Em contraste, nas abelhas expostas à dose 1 de clorantropiliprole (D1; 1,3 $\mu\text{g/mL}$), observou-se maior quantidade de células epiteliais eliminadas para o lúmen do intestino médio, bem como acúmulo de células livres e fragmentadas no interior do lúmen, com maior frequência em comparação aos grupos controle (Figura 1C). Esse padrão foi comprovado pela análise quantitativa, que evidenciou aumento significativo na porcentagem de eliminação celular em relação aos controles (CN e CS; $p < 0,05$), (Figura 3E). Também foi registrado aumento na frequência de núcleos picnóticos (Figura 1D), porém sem diferença estatisticamente significativa em relação aos controles ($p > 0,05$), indicando início de processos celulares degenerativos (Figura 3A). Os ninhos de células regenerativas,

localizados na base do epitélio, apresentaram-se menos densos, com menor número de células e presença de vacuolização (Figura 2C; Figura 3C), ($p > 0,05$). Foram ainda observados halos perinucleares, indicativos de alterações degenerativas iniciais (Figura 1D; Figura 3D), com aumento estatisticamente significativo em relação aos controles, além de redução na altura da borda em escova quando comparada aos controles (Figura 3F). A secreção apócrina apresentou leve aumento, com maior variabilidade entre os indivíduos (Figura 3G), sendo esse aumento estatisticamente significativo em relação aos controles ($p < 0,05$).

Nas abelhas expostas à dose 2 de clorantraniliprole (D2; 2,58 $\mu\text{g/mL}$), as alterações histológicas no intestino médio foram mais intensas. Observou-se elevada eliminação de células epiteliais para o lúmen (Figura 3E), com valores significativamente superiores aos grupos CN e CS ($p < 0,05$), associada a grande acúmulo de células livres, fragmentos celulares e secreção apócrina no interior do lúmen (Figura 3G), ($p < 0,05$), evidenciando maior grau de degeneração tecidual em comparação aos demais grupos (Figura 1E). As vilosidades epiteliais apresentaram-se completamente desestruturadas, com perda da histoarquitetura típica e desorganização das camadas celulares, dificultando a distinção entre os diferentes tipos celulares (Figura 1E). Os ninhos de células regenerativas se apresentaram amplamente danificados, com redução acentuada da densidade celular e aumento da ocorrência de ninhos comprometidos (Figura 2D; Figura 3C), sendo essa redução estatisticamente significativa em relação aos grupos CN, CS e D1 ($p < 0,05$). Houve aumento expressivo na quantidade de núcleos com coloração intensificada e morfologia alterada, compatíveis com processo picnótico avançado (Figura 3A), com diferença estatisticamente significativa em relação aos controles e ao grupo D1. A proporção de células com halo perinuclear permaneceu elevada (Figura 3D), com valores significativamente superiores aos controles ($p < 0,05$), e a borda em escova apresentou redução estatisticamente significativa de altura, associada à desorganização do epitélio (Figura 3F), em relação aos grupos CN, CS e D1 ($p < 0,05$). As vilosidades estavam amplamente desestruturadas, com áreas extensas de descontinuidade epitelial e, em várias regiões, a membrana peritrófica não foi claramente visualizada, sugerindo perda de integridade ou degradação (Figura 1F).

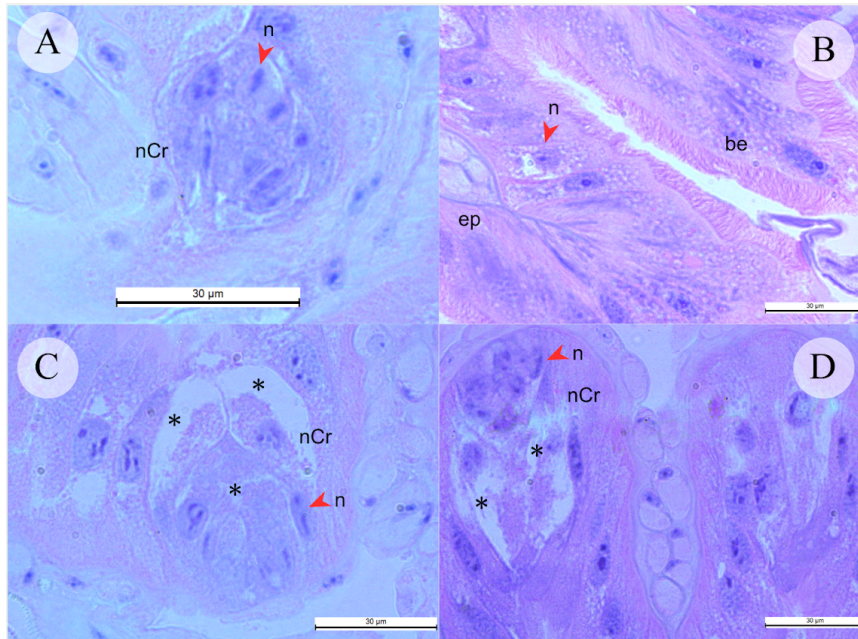
As alterações histológicas observadas no intestino médio apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Observou-se aumento no grau de comprometimento estrutural com concentrações crescentes de clorantraniliprole, sendo o efeito mais acentuado no grupo exposto à maior concentração. As variáveis histológicas analisadas no intestino médio estão representadas na Figura 3, onde são apresentadas as diferenças entre os grupos experimentais.

Figura 1. Organização epitelial e alterações histológicas no intestino médio de *B. morio* em resposta à exposição ao clorantraniliprole (D1 e D2).



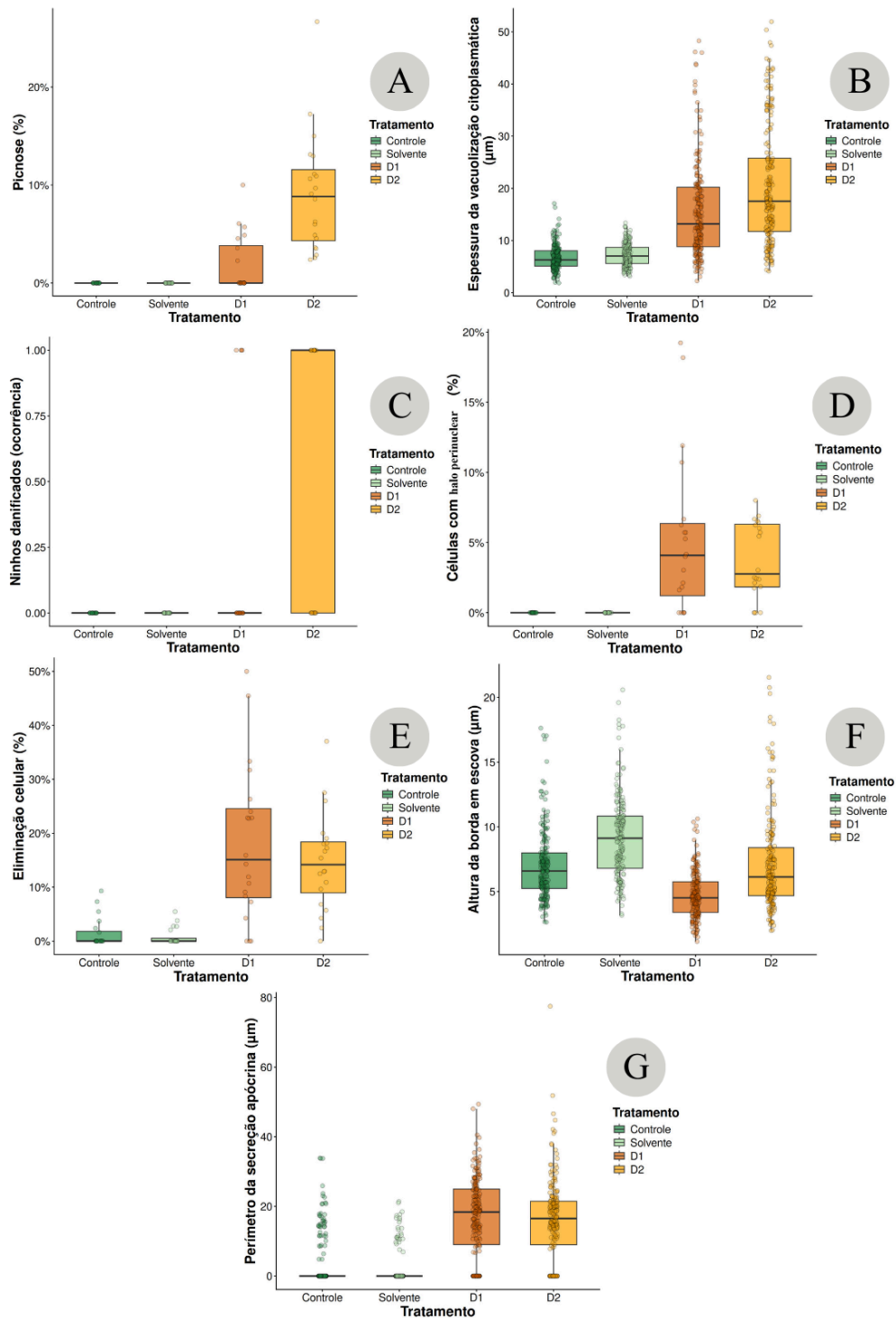
(A) Controle negativo (CN); (B) Controle solvente (CS); (C–D) clorantraniliprole – dose 1 (D1); (E–F) clorantraniliprole – dose 2 (D2). Siglas: L: lúmen; be: borda em escova; sa: secreção apócrina; ep: epitélio; n: núcleo; nCr: ninho de células regenerativas; pbe: perda de borda em escova; ce: célula eliminada. Marcações: ponta de seta vermelha: núcleo; seta vermelha: condensação nuclear; asterisco preto: perda de material citoplasmático; asterisco vermelho: halo perinuclear. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E). Barras de escala: A, B, C, E = 30 µm (40×); D, F = 30 µm (100×). Fonte: Autoria própria, 2026.

Figura 2. Detalhes do intestino médio de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantraniliprole.



(A) Controle negativo (CN); (B) Controle solvente (CS); (C) clorantraniliprole – dose 1 (D1); (D) clorantraniliprole – dose 2 (D2). Siglas: be: borda em escova; ep: epitélio; n: núcleo; nCr: ninho de células regenerativas. Marcações: ponta de seta vermelha: núcleo; asterisco preto: vacuolização. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E). Barras de escala: A–D = 30 µm (100×). Fonte: Autoria própria, 2026.

Figura 3. Alterações histológicas quantitativas no intestino médio de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantranilprole em duas concentrações.



Boxplots das variáveis histológicas quantificadas nos grupos Controle negativo (CN), Controle solvente (CS), Dose 1 (D1) e Dose 2 (D2): (A) núcleos picnóticos; (B) vacuolização citoplasmática; (C) ninhos de células regenerativas danificados; (D) células com halo perinuclear; (E) eliminação celular para o lúmen; (F) altura da borda em escova; e (G) perímetro da secreção apócrina. Os pontos representam valores individuais. Fonte: Autoria própria, 2026.

4.2 Túbulos de Malpighi

Nas abelhas dos grupos controle negativo (CN) e controle solvente (CS), os túbulos de Malpighi apresentaram-se preservados, com lúmen bem definido e livre de detritos celulares (Figura 4A; Figura 4B). As células epiteliais mostraram-se organizadas, com morfologia cilíndrica e núcleos arredondados, localizados predominantemente na porção basal. A cromatina apresentou-se uniformemente distribuída, sem indícios evidentes de picnose nuclear. A borda em escova apical apresentou-se preservada e bem delineada ao longo do epitélio, enquanto o labirinto basal mostrou-se íntegro, com invaginações evidentes da membrana plasmática basal e ausência de alterações estruturais. Não foram observados sinais expressivos de vacuolização, degeneração celular ou desorganização epitelial nas amostras analisadas (Figura 4A; Figura 4B; Figura 5), não sendo identificadas diferenças morfológicas entre os grupos CN e CS, o que foi confirmado pela análise estatística ($p > 0,05$).

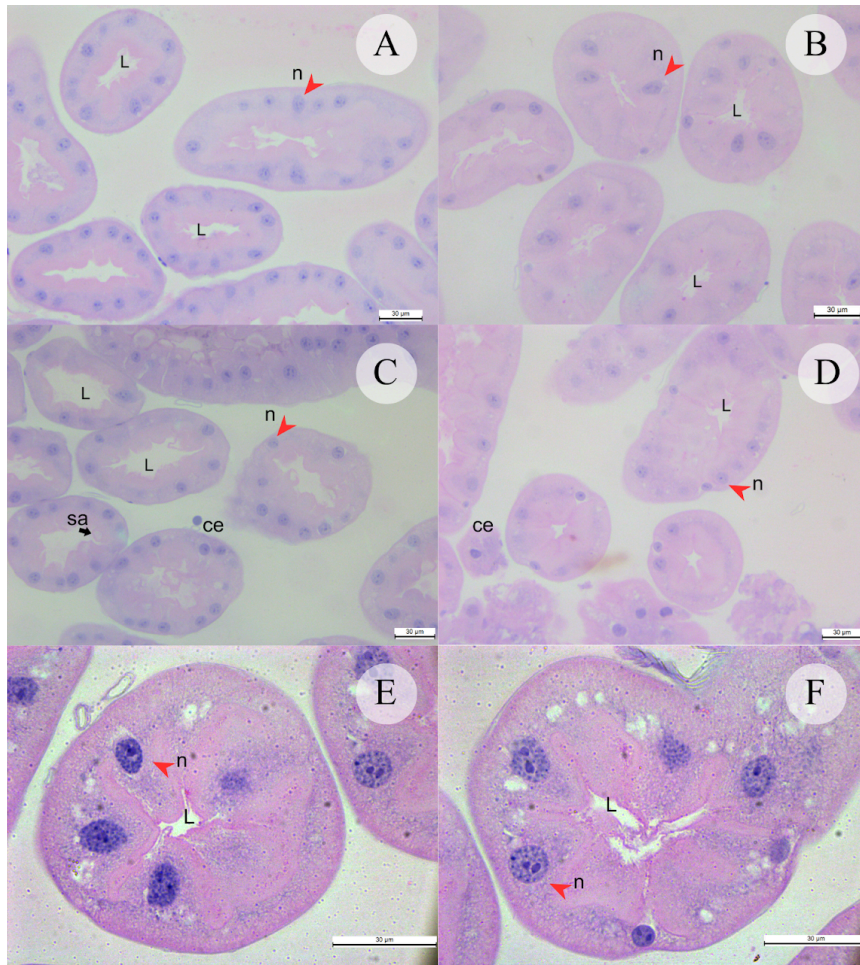
Nas abelhas expostas à dose 1 de clorantraniliprole (D1; 1,3 $\mu\text{g/mL}$), os túbulos de Malpighi apresentaram alterações morfológicas de baixa intensidade (Figura 4C). O lúmen mostrou-se reduzido e com contorno irregular em comparação aos grupos controle. As células epiteliais apresentaram aumento do volume celular, com núcleos localizados principalmente na porção basal, exibindo morfologia variando entre arredondada a ovalada e cromatina mais condensada, disposta em grumos, indicando alterações celulares iniciais. Alguns núcleos apresentaram halo perinuclear e coloração intensificada. A borda em escova encontrava-se presente, porém menos nítida em determinadas regiões, enquanto o labirinto basal permaneceu visível, com invaginações da membrana plasmática preservadas. Foram observados sinais leves de vacuolização citoplasmática, os quais diferiram significativamente dos grupos controle ($p < 0,05$), associados a alterações celulares iniciais, sem evidências de ruptura epitelial nas amostras analisadas (Figura 4C; Figura 5). De forma semelhante, a redução na nitidez da borda em escova também apresentou diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Nas abelhas expostas à dose 2 de clorantraniliprole (D2; 2,58 $\mu\text{g/mL}$), as alterações estruturais nos túbulos de Malpighi foram mais evidentes (Figura 4D, F). O lúmen apresentou-se reduzido e com contorno irregular, e as células epiteliais mostraram-se visivelmente aumentadas em volume, com citoplasma menos corado e áreas claras, com presença de regiões com perda aparente de material citoplasmático (Figura 4E, F). Em algumas regiões, foi possível observar ruptura celular. Os núcleos apresentaram-se reduzidos, com coloração intensificada e morfologia alterada, além de ocorrência frequente de halos

perinucleares associados à condensação da cromatina. A bordadura em escova mostrou-se pouco evidente ou ausente em determinadas regiões (Figura 4D, F). As alterações observadas foram mais frequentes e mais intensas no grupo D2 em comparação aos demais grupos experimentais, apresentando valores significativamente superiores para vacuolização, perda de borda em escova e ocorrência de halos perinucleares ($p < 0,05$).

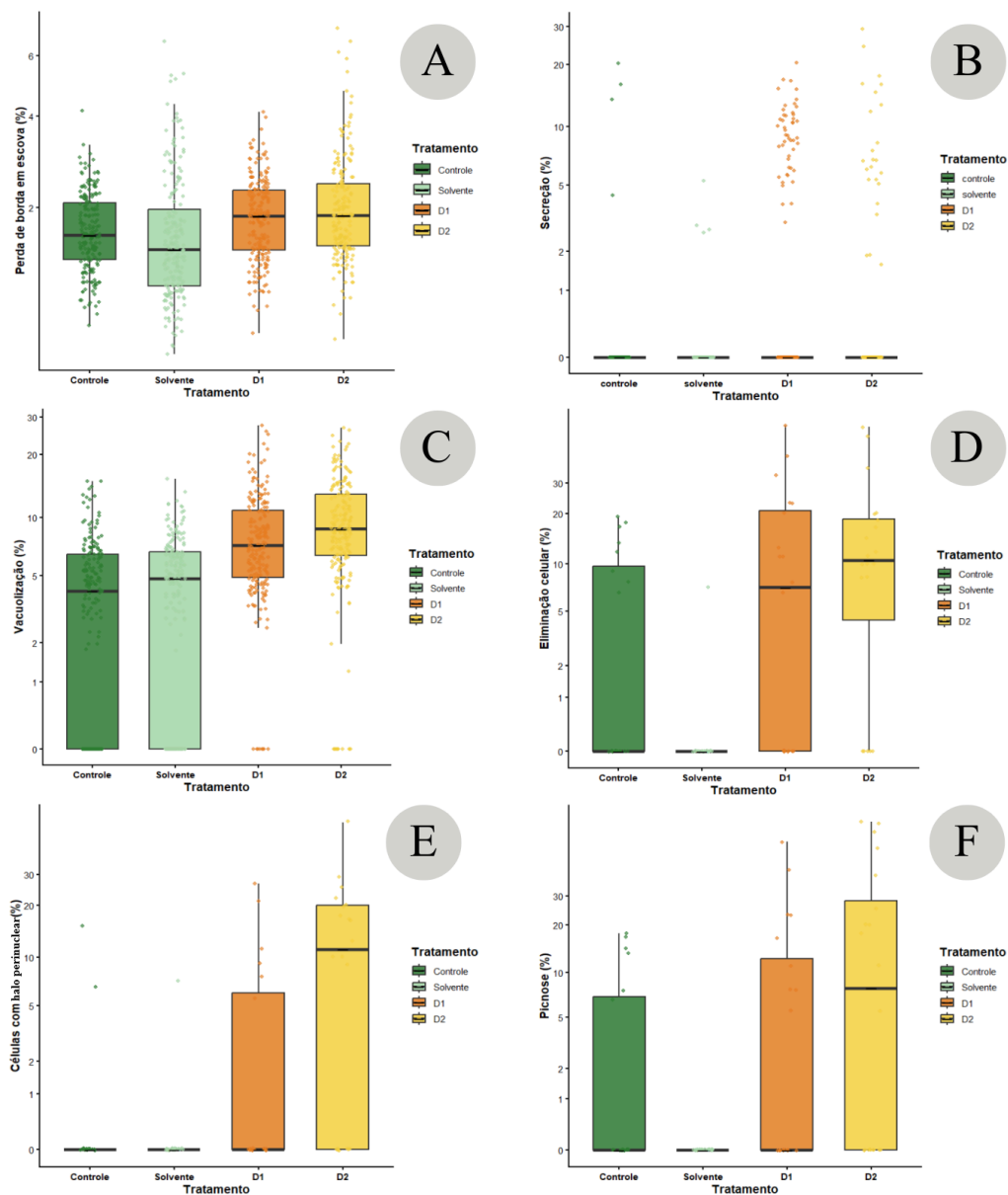
As alterações histológicas observadas nos túbulos de Malpighi foram também evidenciadas pela análise quantitativa apresentada na Figura 5, que indicou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais para os parâmetros perda de borda em escova, vacuolização, eliminação celular, picnose e ocorrência de halos perinucleares ($p < 0,05$). De modo geral, os grupos expostos ao clorantraniliprole (D1 e D2) diferiram dos controles (CN e CS), enquanto não foram observadas diferenças entre CN e CS ($p > 0,05$). Observou-se aumento significativo das alterações nos grupos tratados, com valores mais elevados, em geral, no grupo D2 em comparação ao D1 e aos controles. Esses resultados estão em concordância com as observações qualitativas.

Figura 4. Fotomicrografias dos túbulos de Malpighi de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantranilprole em duas concentrações.



(A) Controle negativo (CN); (B) Controle solvente (CS); (C) clorantranilprole – dose 1 (D1); (D–F) clorantranilprole – dose 2 (D2). Siglas: L: lúmen; n: núcleo; ce: célula eliminada; sa: secreção apócrina. Marcações: ponta de seta vermelha: núcleo. Coloração: hematoxilina e eosina (H&E). Barras de escala: A, B, C, D = 30 µm (40×); E, F = 30 µm (100×). Fonte: Autoria própria, 2026.

Figura 5. Alterações histológicas quantitativas nos túbulos de Malpighi de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantranilprole em duas concentrações.



Boxplots das variáveis histológicas quantificadas nos grupos Controle negativo (CN), Controle solvente (CS), Dose 1 (D1) e Dose 2 (D2): (A) perda de borda em escova; (B) secreção apócrina; (C) vacuolização citoplasmática; (D) eliminação celular para o lúmen; (E) células com halo perinuclear; e (F) núcleos picnóticos. Os pontos representam valores individuais. Fonte: Autoria própria, 2026.

4.3 Músculo de voo

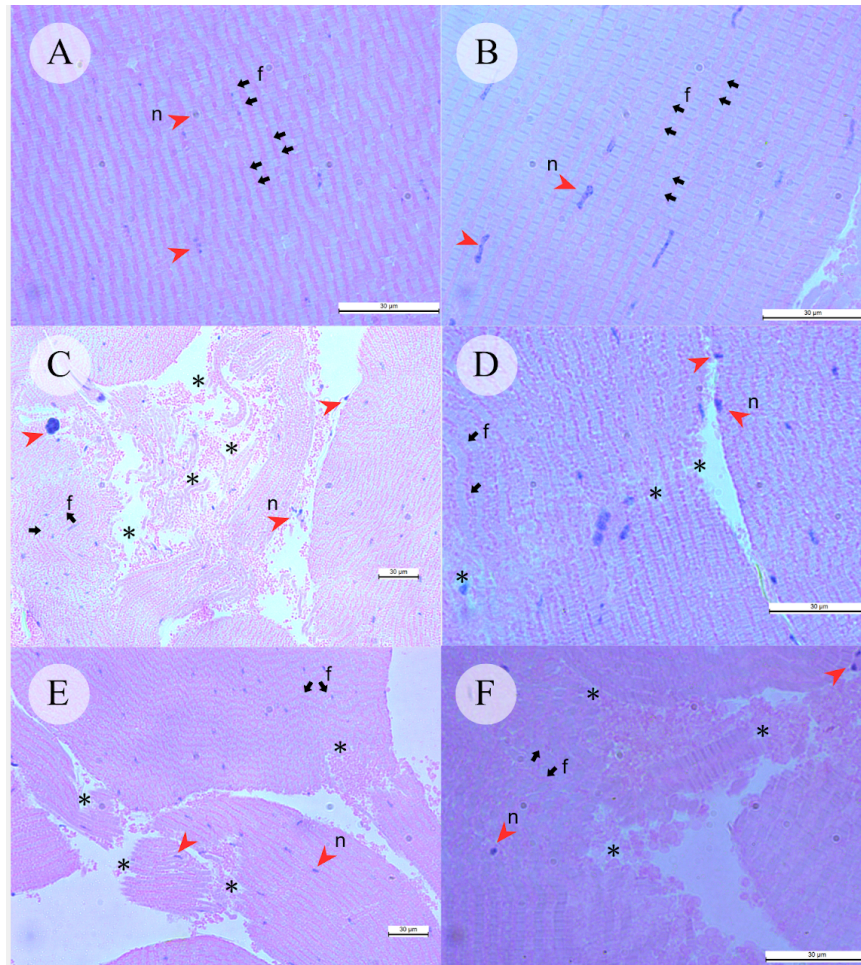
Nas abelhas dos grupos controle negativo (CN) e controle solvente (CS), a musculatura de vôo se apresentou preservada, com fibras musculares estriadas bem organizadas, paralelas entre si e com estriações transversais nítidas (Figura 6A; Figura 6B).

Os núcleos se apresentaram alongados a ovais, distribuídos de forma regular ao longo das fibras, sem alterações morfológicas evidentes ou sinais de condensação da cromatina. Não foram observadas áreas de desorganização miofibrilar, ruptura das fibras ou aumento dos espaços intercelulares, indicando integridade estrutural do tecido muscular. O grupo controle solvente apresentou padrão histológico semelhante ao controle negativo, não sendo identificadas alterações morfológicas associadas à presença de acetona na concentração utilizada.

Em contraste, nas abelhas expostas à dose 1 de clorantraniliprole (D1; 1,3 µg/mL), a musculatura de voo apresentou alterações estruturais de baixa intensidade. Foram observadas áreas com desorganização das fibras musculares, perda parcial da regularidade das estriações e aumento dos espaços intercelulares (Figura 6C). Alguns núcleos apresentaram coloração mais intensa e alterações morfológicas sutis, sugerindo início de processos degenerativos. Também foram identificadas regiões com vacuolização citoplasmática de baixa frequência, sem ruptura extensa das fibras musculares (Figura 6D).

Nas abelhas expostas à dose 2 de clorantraniliprole (D2; 2,58 µg/mL), as alterações na musculatura de voo foram mais evidentes e extensas (Figuras 6E, F). As fibras musculares apresentaram-se desorganizadas, com perda acentuada das estriações transversais e aumento dos espaços intercelulares. Foram observadas áreas de ruptura das fibras, vacuolização citoplasmática intensa e núcleos com coloração intensificada e morfologia alterada, compatíveis com processos degenerativos avançados. Em algumas regiões, a integridade do tecido muscular encontrava-se severamente comprometida, com maior extensão das áreas afetadas em comparação aos demais grupos experimentais.

Figura 6. Fotomicrografias da musculatura de voo de *B. morio* nos grupos controle e expostos ao clorantraniliprole em duas concentrações.



(A) Controle negativo (CN) e (B) Controle solvente (CS), apresentando fibras musculares (f) íntegras, com estriações transversais nítidas e núcleos (n) centrais com cromatina frouxa. (C–D) clorantraniliprole – dose 1 (D1), evidenciando início de fragmentação do tecido, com formação de espaços interfibrilares () e núcleos com coloração intensificada (n). (E–F) clorantraniliprole – dose 2 (D2), demonstrando desorganização severa da musculatura, lise citoplasmática com perda das estriações, formação de extensas lacunas () e núcleos condensados (n). Barras de escala: C, E = 30 µm (40×); A, B, D, F = 30 µm (100×). Fonte: Autoria própria, 2025.

4.4. Análise comportamental

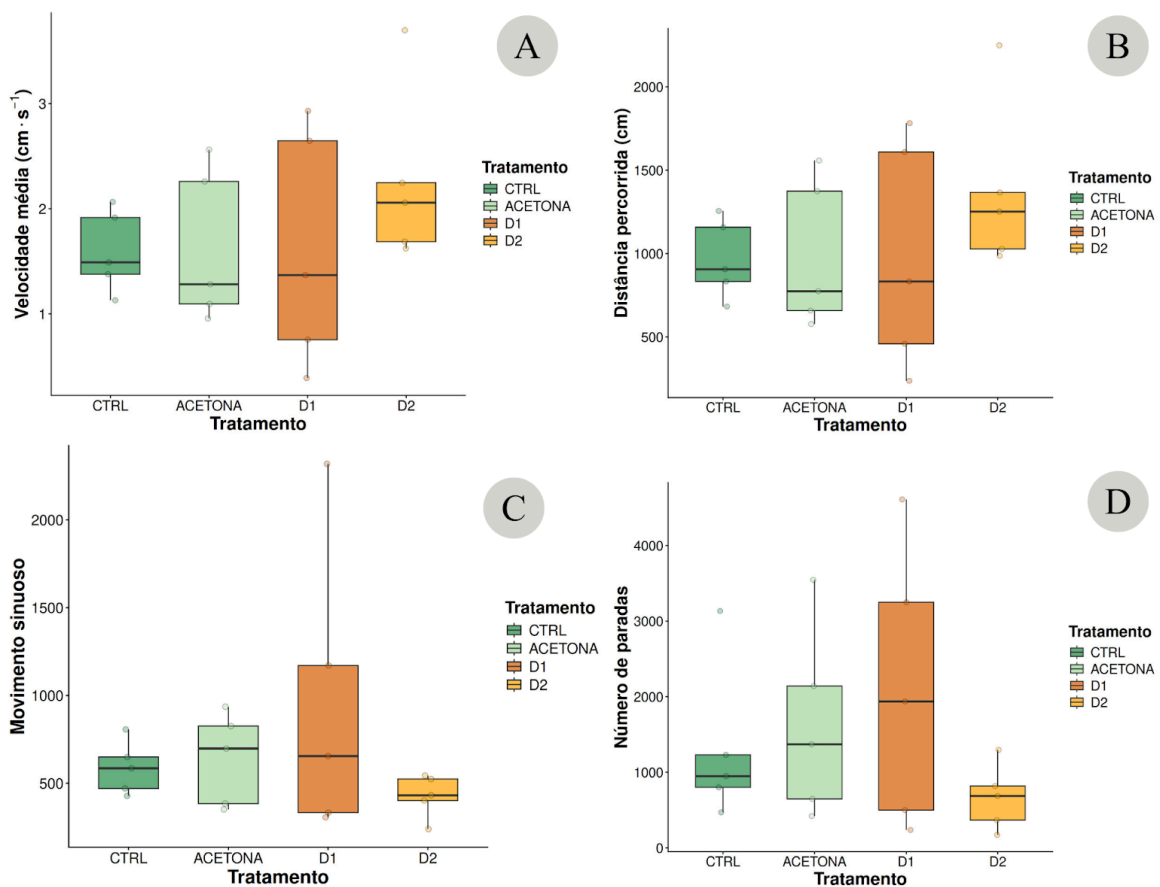
As variáveis comportamentais avaliadas (velocidade média, distância percorrida, movimento sinuoso e número de paradas) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (CN e CS) e aqueles expostos ao clorantraniliprole (D1 e D2) (ANOVA; $p > 0,05$). A velocidade média das operárias permaneceu semelhante entre

os tratamentos, variando de $1,60 \pm 0,39$ cm/s nos grupos controle a $2,26 \pm 0,84$ cm/s na maior dose testada (Figura 7A).

De maneira semelhante, a distância total percorrida não foi alterada pela exposição oral ao inseticida, com valores médios próximos entre todos os grupos experimentais (Figura 7B). Em relação ao padrão de deslocamento, o índice de movimento sinuoso (*meandering*) não indicou desorganização locomotora. Embora valores mais elevados tenham sido registrados na D1, essas variações não diferiram estatisticamente dos demais tratamentos (Figura 7C).

O número de paradas também se manteve semelhante entre os grupos, indicando que, nas doses e no período de exposição avaliados, o clorantraniliprole não comprometeu a atividade locomotora das abelhas (Figura 7D).

Figura 7. Parâmetros comportamentais avaliados em *B. morio* nos grupos controle, solvente e expostos ao clorantraniliprole em duas concentrações.



(A) Velocidade média (cm/s); (B) distância total percorrida (cm); (C) movimento sinuoso (*meandering*); (D) número total de paradas, avaliados em *B. morio* dos grupos controle (CTRL),

solvente (ACETONA) e expostos ao clorantraniliprole nas doses D1 e D2. As colunas representam a média e as barras verticais indicam o desvio padrão. Fonte: Autoria própria, 2026.

5. DISCUSSÃO

O intestino médio é a principal região de digestão e absorção dos insetos, sendo responsável pela quebra dos alimentos ingeridos e pela assimilação dos nutrientes. A camada epitelial é composta por células prismáticas com borda em escova desenvolvida, células regenerativas organizadas em grupos, denominados ninhos regenerativos e células endócrinas basais, sendo revestido internamente pela membrana peritrófica, que atua como uma barreira física contra agentes patogênicos e compostos tóxicos (Cruz-Landim, 2009).

No grupo CN e CS, o epitélio apresentou aspecto preservado, sem sinais evidentes de desorganização estrutural. Algumas células livres no lúmen e pequenos espaços claros intracelulares também foram observados, mas são considerados achados fisiológicos resultantes da renovação epitelial normal, caracterizada pela extrusão, processo em que células senescentes ou danificadas são eliminadas de forma controlada da superfície epitelial em direção ao lúmen, e pela atividade secretora das células intestinais (Junqueira; Carneiro, 2016; Ngo *et al.*, 2022; Zhang; Edgar, 2022). Esses mecanismos sustentam a integridade do tecido, indicando um epitélio funcional, metabolicamente ativo e morfológicamente íntegro, além de confirmar que a presença do solvente não interfere na organização histológica do intestino médio.

Nos grupos expostos ao clorantraniliprole, observou-se um padrão claro de danos progressivos. Na D1, a eliminação celular para o lúmen e a presença de núcleos picnóticos sugerem ativação de mecanismos iniciais de renovação e remoção celular, compatíveis com uma resposta adaptativa do epitélio frente ao estresse tóxico, conforme descrito para epitélios intestinais de insetos submetidos a agrotóxicos (Ngo *et al.*, 2022; Zhang; Edgar, 2022). O aumento da atividade dos ninhos regenerativos indica tentativa de compensação tecidual, visando a manutenção da integridade epitelial, mecanismo também associado à regulação da homeostase intestinal nessas condições. No entanto, com o aumento da dose (D2), observa-se que essa resposta se torna insuficiente, com redução da densidade celular nos ninhos regenerativos e presença de núcleos escuros e condensados, compatíveis com morte celular. A fragmentação ou ausência da membrana peritrófica sugere comprometimento da função de barreira, potencializando a exposição do epitélio a agrotóxicos, alteração semelhante à descrita por Cruz-Landim (2009), Castro *et al.* (2021) e Zhu *et al.* (2023) em abelhas expostas a diferentes estressores.

Esses achados indicam uma transição de resposta compensatória (aumento da proliferação celular para repor o dano) para uma resposta não compensatória, onde a capacidade regenerativa é superada pelo nível de dano. Nesse contexto, as alterações observadas não apenas refletem dano estrutural, mas implicam prejuízos funcionais, uma vez que a degradação da borda apical, o espaçamento entre células e a eliminação de enterócitos para o lúmen comprometem as funções digestivas e de barreira do epitélio (Junqueira; Carneiro, 2016).

Resultados semelhantes foram descritos por Catae *et al.* (2014), que observaram, em *A. mellifera* expostas ao inseticida tiametoxam, alterações estruturais tanto no intestino médio quanto nos túbulos de Malpighi, incluindo vacuolização citoplasmática, perda da organização epitelial e sinais evidentes de citotoxicidade. Esses efeitos histológicos estão diretamente relacionados à absorção de substâncias tóxicas pelo intestino e ao acúmulo intracelular de resíduos, como observado também neste trabalho.

De forma semelhante, da Silva *et al.* (2024) observaram alterações estruturais importantes no intestino médio e nos túbulos de Malpighi de *Frieseomelitta varia* (Lepeletier, 1836) expostas de forma subletal à combinação de tiametoxam e piraclostrobina. No intestino, os autores relataram desorganização epitelial, vacuolização do citoplasma, deformação dos núcleos e rarefação das microvilosidades, comprometendo diretamente a absorção de nutrientes e a função de barreira intestinal. Os danos foram compatíveis com os observados neste estudo em *B. morio*.

Ainda que os efeitos histológicos do clorantraniliprole em abelhas não tenham sido diretamente explorados na literatura, estudos realizados em outros insetos com estrutura intestinal semelhante oferecem suporte para interpretar os danos observados nesta pesquisa. Em *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818), conhecida popularmente como lagarta-da-soja, o clorantraniliprole causou degeneração dos microvilos, vacuolização do citoplasma, fragmentação celular e perda da integridade da membrana peritrófica, o que levou à redução da taxa respiratória e da mobilidade dos indivíduos (Castro *et al.*, 2021). Já em *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758), o bicho-da-seda, o clorantraniliprole alterou a microbiota intestinal e comprometeu a membrana peritrófica, resultando em maior vulnerabilidade a infecções e processos associados ao estresse oxidativo (Zhu *et al.*, 2023). Esses achados reforçam que a integridade intestinal, mesmo em espécies distintas, é um alvo recorrente de toxicidade por diamidas.

Portanto, mesmo com a escassez de pesquisas que buscam avaliar os efeitos do clorantraniliprole sobre as abelhas, principalmente em doses subletais, os dados aqui

apresentados preenchem uma importante lacuna na literatura e reforçam a necessidade de análises morfológicas aprofundadas sobre os efeitos subletais desse composto. O intestino médio, sendo altamente ativo em absorção, acaba sendo o primeiro ponto de contato com substâncias tóxicas ingeridas, e seus danos estruturais, como a perda da membrana peritrófica e da capacidade regenerativa, comprometem diretamente o metabolismo energético e, por consequência, o voo e a sobrevivência da abelha (Lourenço *et al.*, 2012).

Ainda, vale destacar que a análise quantitativa de parâmetros histológicos, como densidade celular, proporção de células eliminadas e organização dos ninhos regenerativos, permitiu sustentar estatisticamente os padrões morfológicos observados, reforçando as interpretações discutidas neste capítulo.

Além do intestino médio, os túbulos de Malpighi também foram afetados pela exposição ao clorantropilprole, apresentando alterações morfológicas relevantes e dose-dependentes. Esses túbulos são os principais órgãos excretores em insetos e desempenham papel central na homeostase e na desintoxicação, atuando diretamente na excreção de resíduos metabólicos e na regulação osmótica e iônica. Por serem altamente ativos metabolicamente, mostram-se particularmente sensíveis à presença de xenobióticos (Cruz-Landim, 2009; Farina, 2022).

No grupo CN e CS, os túbulos de *B. morio* apresentaram morfologia preservada, com células epiteliais organizadas, lúmen bem definido e ausência de vacuolizações ou alterações nucleares, caracterizando um padrão compatível com a manutenção da atividade excretora e do equilíbrio osmótico do tecido, conforme descrito para insetos em condições fisiológicas (Cruz-Landim, 2009). Nos grupos expostos ao clorantropilprole, as alterações observadas sugerem prejuízo progressivo da funcionalidade dos túbulos de Malpighi. Em D1, o aumento do volume celular, a redução da densidade citoplasmática e os indícios de picnose podem estar associados a um desequilíbrio inicial nos processos osmóticos e metabólicos das células epiteliais, indicando uma resposta celular ao estresse químico compatível com mecanismos gerais de resposta ao estresse em epitélios de insetos (Ngo *et al.*, 2022; Zhang; Edgar, 2022). Com o aumento da dose (D2), esse padrão de alteração se torna mais evidente, sendo observado citoplasma com aspecto mais claro, núcleos condensados e perda da definição da borda apical, além de colapso parcial da organização epitelial. Essas alterações sugerem prejuízo nos mecanismos de transporte ativo e na regulação iônica, fundamentais para a função dos túbulos de Malpighi, caracterizando um quadro de disfunção celular mais acentuada (Rossi *et al.*, 2013).

Esses achados são consistentes com os efeitos descritos no intestino médio, onde a menor dose ainda permitia alguma resposta regenerativa, cuja função foi progressivamente superada na dose mais alta. Nos túbulos, esse padrão se manifesta pela perda funcional das células epiteliais, sugerindo um esgotamento da capacidade de excreção e eliminação de toxinas, o que pode potencializar os danos sistêmicos (Cruz-Landim, 2009; Rossi *et al.*, 2013).

A análise integrada dos resultados indica que, embora o clorantraniliprole tenha como principal alvo os canais de rianodina na musculatura, sua natureza sistêmica e a via oral de exposição fazem com que o composto atinja diretamente tecidos como o intestino médio e os túbulos de Malpighi, os primeiros a processar e absorver o composto. Assim, os danos observados nesses órgãos não devem ser interpretados como efeitos secundários, mas como consequência direta da via de exposição oral. Isso reforça que mesmo inseticidas considerados seletivos podem comprometer múltiplos órgãos simultaneamente, especialmente aqueles envolvidos em absorção, metabolismo e excreção (Dively; Kamel, 2012; Haas *et al.*, 2021).

Achados semelhantes foram relatados por da Silva *et al.* (2024) em *F. varia*, onde a exposição subletal a tiametoxam e piraclostrobina induziu vacuolização intensa, apoptose e desorganização epitelial dos túbulos de Malpighi. Efeitos compatíveis também foram descritos por Rossi *et al.* (2013) em *A. mellifera* exposta cronicamente ao imidacloprido, incluindo aumento de núcleos picnóticos, perda de porções celulares e degradação do labirinto basal, estrutura essencial para as trocas com a hemolinfa.

Portanto, os dados obtidos neste estudo indicam que os túbulos de Malpighi, assim como o intestino médio, estão entre os tecidos mais suscetíveis aos efeitos subletais provocados pela exposição oral ao clorantraniliprole. Alterações morfológicas nesses órgãos podem comprometer mecanismos fundamentais de homeostase e desintoxicação, com possíveis repercussões negativas sobre a sobrevivência individual e o desempenho ecológico dessas espécies (Cruz-Landim, 2009; Haas *et al.*, 2021). Os resultados reforçam que órgãos metabolicamente ativos, como o epitélio intestinal e os túbulos de Malpighi, constituem alvos críticos em análises de toxicidade subletal.

Acompanhando o padrão de degradação observado no intestino e nos túbulos de Malpighi, a musculatura de voo também apresentou alterações estruturais evidentes e dose-dependentes em resposta à exposição ao clorantraniliprole. Este inseticida, pertencente à classe das diamidas antranílicas, atua como modulador dos receptores de rianodina (RyRs), que controlam a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático para o citosol (Haas *et al.*,

2021). A ativação desses receptores provoca fluxo contínuo de cálcio, resultando em contrações musculares exaustivas, o que pode levar à desorganização das miofibrilas e à perda da integridade estrutural das fibras musculares, compatível com as alterações histológicas observadas neste estudo.

Nas abelhas expostas, especialmente na dose mais alta (D2), a organização sarcomérica foi comprometida, com fragmentação tecidual e várias lacunas interfibrilares. Essas rupturas indicam que a hiperexcitação muscular induzida pelo clorantraniliprole excedeu a resistência mecânica das miofibrilas, levando ao rompimento da coesão do tecido. Alterações similares na integridade da musculatura de voo foram descritas por Abdalla *et al.* (2016) em operárias de *B. morio* expostas ao glifosato, onde a desorganização das fibras e a formação de espaços entre os feixes musculares comprometeram a sustentação necessária para o voo eficiente.

Além das alterações estruturais, a presença de núcleos condensados e o aspecto granular do sarcoplasma, especialmente na dose mais elevada, reforçam a citotoxicidade do clorantraniliprole sobre a musculatura de voo. Esse tecido é altamente especializado, composto por filamentos espessos organizados em arranjos cristalinos de miosina e proteínas associadas, responsáveis por conferir resistência, elasticidade e eficiência contrátil necessárias para a sustentação do voo. Assim, mesmo alterações discretas na organização dessas fibras, como vacuolizações localizadas ou perda de proteínas estruturais, já são suficientes para comprometer significativamente a capacidade funcional, conforme demonstrado por Li *et al.* (2023). Skandalis *et al.* (2011) demonstraram que o desempenho de voo em *B. impatiens* está intimamente relacionado à maturação morfológica e metabólica da musculatura, sendo que perturbações nesse processo, ainda que sutis, reduzem a competência de voo em adultos jovens. Nesse contexto, a lise citoplasmática observada no presente estudo sugere que o clorantraniliprole promove um processo degenerativo progressivo das proteínas estruturais musculares, com possíveis reflexos sobre o desempenho de voo.

Na avaliação da musculatura de voo, não foi realizada análise estatística quantitativa, uma vez que esse tecido ainda é pouco explorado em estudos histológicos com abelhas, especialmente para o gênero *Bombus*. Até o momento, não há parâmetros histológicos consolidados que definam de forma objetiva quais variáveis devem ser analisadas nesse tecido, o que dificulta a aplicação de análises quantitativas padronizadas. Diante disso, a abordagem adotada neste estudo foi qualitativa, priorizando a identificação de alterações estruturais evidentes e biologicamente relevantes, compatíveis com o mecanismo de ação do clorantraniliprole. Contudo, vale destacar que já estão planejadas, para etapas subsequentes e

antes da submissão dos resultados para publicação, a aplicação de técnicas histológicas diferenciais e complementares, com o objetivo de refinar a caracterização da musculatura de voo e estabelecer parâmetros quantitativos mais robustos para futuras análises.

Dessa forma, a musculatura de voo também foi diretamente afetada pelos efeitos subletais do clorotraniliprole, acompanhando o padrão de alterações observado nos demais tecidos analisados. Enquanto o intestino médio e os túbulos de Malpighi sofreram danos por serem os primeiros órgãos a processar o ingrediente ativo, a musculatura é atingida como alvo final do mecanismo de ação do inseticida, o que evidencia um efeito sistêmico decorrente da exposição oral ao composto. O comprometimento integrado desses tecidos cria um cenário crítico para a sobrevivência das abelhas, uma vez que alterações no intestino e nos túbulos de Malpighi podem comprometer processos de absorção, metabolismo e excreção, enquanto os efeitos sobre a musculatura de voo afetam diretamente a capacidade de locomoção. Dessa forma, a ação combinada sobre esses sistemas pode resultar em prejuízos funcionais relevantes, capazes de afetar atividades essenciais como o voo, o forrageio e a comunicação dentro da colônia (Skandalis *et al.*, 2011; Grella, 2017; Carneiro *et al.*, 2022), indicando que mesmo em níveis subletais, o clorotraniliprole pode impactar o desempenho individual e ecológico das abelhas.

Em *A. mellifera*, por exemplo, a exposição ao inseticida piriproxifem comprometeu a diferenciação das fibras de voo, indicando que alterações no desenvolvimento e na organização das fibras musculares podem interferir no amadurecimento funcional da musculatura (Fernandez; Cruz-Landim; Malaspina, 2012). As alterações musculares aqui observadas podem se somar aos efeitos intestinais e excretores, reduzindo a eficiência do voo e, conseqüentemente, comprometendo a sobrevivência individual e o desempenho ecológico das populações de abelhas (Skandalis *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2023).

Nesse contexto, as alterações comportamentais podem estar diretamente relacionadas ao curto período de exposição ao clorotraniliprole, que foi limitado a quatro horas, seguido por alimentação *ad libitum* sem o inseticida. Esse método difere de estudos que reportaram efeitos comportamentais em abelhas expostas por períodos mais prolongados. Em *B. terrestris*, por exemplo, a exposição ao imidacloprido por nove dias resultou em redução da atividade locomotora, alterações no voo e prejuízos no aprendizado, especialmente quando avaliados em arenas maiores e sob maior demanda fisiológica (Fisher, K. H. *et al.*, 2023). De forma semelhante, Williamson *et al.* (2014) observaram algumas alterações na função motora básica de *A. mellifera* após 24 horas de exposição a neonicotinoides, incluindo comprometimento do controle postural e aumento do tempo de autolimpeza, embora outros

comportamentos locomotores não tenham sido significativamente afetados. Resultados compatíveis também foram observados em estudos que avaliaram a locomoção em arenas restritas ou placas de Petri, nos quais a exposição a inseticidas sistêmicos levou à redução da distância percorrida ou à alteração da atividade motora (Teeters *et al.*, 2012; Williamson *et al.*, 2014).

De modo geral, investigações comportamentais ainda se concentram em um número limitado de espécies e apresentam grande variação quanto ao tempo de exposição, às doses testadas e aos protocolos experimentais, sendo relativamente menos frequentes para espécies do gênero *Bombus*. Esse contexto indica que efeitos comportamentais tendem a se manifestar após exposições mais prolongadas ou sob condições experimentais que impõem maior exigência fisiológica. Assim, os resultados comportamentais obtidos neste trabalho não contradizem os danos morfofisiológicos observados, mas reforçam a importância de abordagens integradas e de exposições prolongadas para a detecção de impactos subletais significativos.

Diante das evidências do prejuízo causado por doses subletais em organismos não alvo, agências reguladoras, como a EFSA (*European Food Safety Authority*), têm reforçado a necessidade de avaliação de doses subletais e de *endpoints* específicos para identificar impactos fisiológicos relevantes de inseticidas nas abelhas, especialmente em situações onde a mortalidade não é significativa (EFSA, 2019; Fisher, A. *et al.*, 2023). Esses efeitos subletais podem comprometer a viabilidade das colônias a longo prazo, afetando comportamentos essenciais, reprodução e resistência a estresses ambientais, mesmo na ausência de morte dos indivíduos (Gill; Ramos-Rodriguez; Raine, 2012).

Portanto, os dados morfológicos e fisiológicos aqui apresentados, que indicam comprometimento dos órgãos absorptivo, excretor e da musculatura de voo, reforçam a importância de se considerar esses *endpoints* subletais como indicadores sensíveis da toxicidade do clorotraniliprole, principalmente para espécies nativas. Esse quadro ressalta a necessidade de avaliações integradas e de longo prazo, que considerem não apenas a mortalidade, mas também os impactos subletais nos diferentes sistemas fisiológicos das abelhas, para uma melhor compreensão dos riscos ambientais associados ao uso do clorotraniliprole e de outros inseticidas sistêmicos.

6. CONCLUSÃO

A análise morfofisiológica de *B. morio* frente à exposição oral ao clorantraniliprole reforça a relevância da avaliação de efeitos subletais em estudos ecotoxicológicos com abelhas. A abordagem adotada neste capítulo permitiu observar que impactos estruturais e funcionais, mesmo que não letais, podem comprometer o desempenho e a viabilidade das abelhas em níveis individuais e populacionais.

A investigação de órgãos envolvidos na absorção, excreção e locomoção demonstrou o potencial dessas estruturas como indicadores sensíveis da toxicidade de agrotóxicos. Os resultados evidenciaram que o clorantraniliprole promoveu alterações no intestino médio, nos túbulos de Malpighi e na musculatura de voo, o que pode ser explicado pela exposição por via oral, associada ao caráter sistêmico do clorantraniliprole. Enquanto os órgãos absorptivo e excretor foram afetados por participarem diretamente do processamento do ingrediente ativo, a musculatura apresentou danos compatíveis com a ativação dos receptores de rianodina. Esse conjunto de alterações indica que os efeitos subletais comprometem múltiplos sistemas fisiológicos essenciais à sobrevivência das abelhas, muitas vezes não detectados em avaliações baseadas apenas na letalidade.

Dessa forma, este trabalho reforça a importância de abordagens integradas na ecotoxicologia de abelhas, considerando não apenas a sobrevivência, mas também os efeitos fisiológicos que podem comprometer a funcionalidade das populações nativas frente à crescente pressão de agrotóxicos no ambiente.

7. REFERÊNCIAS

ABDALLA, F. C. *et al.* Efeito do cádmio e do glifosato na musculatura de mamangavas.

Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente, v. 6, p. 1–9, 2016. Disponível em:

<https://revistas.univeritas.com/index.php/ctambiente/article/view/3618>.

BERINGER, J.; MACIEL, F. L.; TRAMONTINA, F. O declínio populacional das abelhas: causas, potenciais soluções e perspectivas futuras. **Revista Eletrônica Científica da**

UERGS, v. 5, n. 1, p. 18–27, abr. 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.21674/2448-0479.51.18-27>.

BRADLEY, T. J. The excretory system: structure and physiology. *In*: KERKUT, G. A.;

GILBERT, L. I. (ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**.

London: Pergamon, 1985. v. 4, p. 421–465.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Agrotóxicos**: informações técnicas e registros de ingredientes ativos no Brasil. Brasília, DF: MAPA, 2021. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**: sistema de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, DF: MAPA, 2019. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons.

CACCIA, S.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTI, G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. **Cell and Tissue Research**, v. 377, n. 3, p. 505–525, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>.

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

CATAE, A. F. *et al.* Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 4, p. 274–281, abr. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jemt.22339>.

CASTRO, B. M. C. E. *et al.* Exposure to chlorantraniliprole reduces locomotion, respiration, and causes histological changes in the midgut of velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemosphere**, v. 263, p. 128008, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128008>.

CECCHETTO, F. *et al.* Occurrence of chlorpyrifos and organochlorine pesticides in a native bumblebee (*Bombus pauloensis*) living under different land uses in the southeastern Pampas, Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 905, p. 167117, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167117>

COLLET, C. *et al.* Elementary calcium release events in the skeletal muscle cells of the honey bee *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 11, art. 16867, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96028-w>.

COSTA, L. F.; PIRES, G. L. P. Análise histórica sobre a agricultura e o advento do uso de agrotóxicos no Brasil. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – TOLEDO PRUDENTE CENTRO UNIVERSITÁRIO, 12., 2016, Presidente Prudente. **Anais [...]**. Presidente Prudente: Toledo Prudente, 2016.

CÓRDOVA, D. *et al.* Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 3, p. 196–214, mar. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>.

CRUZ-LANDIM, C. da. **Abelhas**: morfologia e função de sistemas. Ribeirão Preto: Holos, 2009.

CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M.; SERRÃO, E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Comparative Biology**, v. 1, p. 29–40, 1996.

DA SILVA, J. A. *et al.* Sublethal exposure to thiamethoxam and pyraclostrobin affects the midgut and Malpighian tubules of the stingless bee *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Ecotoxicology**, v. 33, n. 8, p. 875–883, out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-024-02786-4>.

DENECKE, S. *et al.* How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, p. 22–35, dez. 2018. Disponível em <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.10.005>.

DIVELY, G. P.; KAMEL, A. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4449–4456, maio 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf205393x>.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). **EFSA Journal**, v. 17, n. 6, p. 1–124, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5758>.

FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 774, p. 145679, jun. 2021.

FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Fipronil exposure compromises respiration and damages the Malpighian tubules of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, p. 88101–88108, ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21858-8>.

FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Exposure of the stingless bee *Melipona scutellaris* to imidacloprid, pyraclostrobin, and glyphosate, alone and in combination, impairs walking activity and fat body morphology and physiology. **Environmental Pollution**, v. 348, p. 123783, maio 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123783>.

FARINA, W. M. Multiple functions of Malpighian tubules in insects. **Insects**, v. 13, n. 11, p. 1001, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects13111001>.

FERNANDEZ, F. C.; CRUZ-LANDIM, C.; MALASPINA, O. Influence of the insecticide pyriproxyfen on the flight muscle differentiation of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 844–848, jun. 2012. Disponível em: . Acesso em: <https://doi.org/10.1002/jemt.22003>.

FISHER, A. *et al.* Breaking the cycle: reforming pesticide regulation to protect pollinators. **BioScience**, v. 73, n. 11, p. 808–813, nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/biosci/biad088>.

FISHER, K. H. *et al.* Impairment of learning and locomotor activity in *Bombus terrestris* exposed to imidacloprid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 371–381, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.5611>.

FRANCO, C. R.; PELAEZ, V. A. A (des)construção da agenda política de controle dos agrotóxicos no Brasil. **Ambiente & Sociedade**, v. 19, n. 3, p. 215–232, jul./set. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-4422ASOC137357V1932016>.

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, nov. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11585>.

GOMES, I. N. *et al.* Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 97–107, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02145-8>.

GONÇALVES, W. G. *et al.* Morfologia do intestino médio de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 341–349, jun. 2014.

GOULSON, D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 977–987, ago. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>.

GRELLA, T. S. **Efeitos do inseticida fipronil sobre o sistema digestivo médio e túbulos de Malpighi de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2017.

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

HAAS, J. *et al.* A mechanism-based approach unveils metabolic routes potentially mediating chlorantraniliprole synergism in honey bees, *Apis mellifera* L., by azole fungicides. **Pest Management Science**, v. 78, n. 3, p. 965–973, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.6706>.

IPBES – INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES. **The assessment report on pollinators, pollination and food production**. Bonn: IPBES Secretariat, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/ca8908en>.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

LAHM, G. P.; CORDOVA, D.; BARRY, J. D. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 12, p. 4127–4133, jun. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.018>.

LI, J. *et al.* Structure of the flight muscle thick filament from the bumble bee, *Bombus ignitus*, at 6 Å resolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 1, p. 377, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms24010377>.

LOURENÇO, C. T. *et al.* Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 4, p. 921–924, out. 2012.

LOURENCETTI, A. P. S. *et al.* Surrogate species in pesticide risk assessments: toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, art. 120842, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120842>. Acesso em: 30 jun. 2025.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 3/4, p. 303–309, 2006.

NOCELLI, R. C. F. *et al.* **Riscos de pesticidas sobre as abelhas**. Brasília: Embrapa, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69299/1/Roberta.pdf>. Acesso em: 23 jun. 2025.

NGO, P. A. *et al.* Impact of epithelial cell shedding on intestinal homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4160, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23084160>.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Test no. 247: Bumblebee, acute oral toxicity test**. Paris: OECD, 2017. Disponível em: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-no-247-bumblebee-acute-oral-toxicity-test-9789264284128-en.htm>. Acesso em: 11 out. 2023.

OLIVEIRA, R. A. *et al.* Histopathological effects of imidacloprid on midgut and Malpighian tubules of *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 460–469, abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.22693>.

OGÂ, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PATRÍCIO-ROBERTO, G. B. *et al.* The importance of bees for eggplant cultivations (Hymenoptera: Apidae, Andrenidae, Halictidae). **Sociobiology**, v. 59, n. 3, 2012.

POTTS, S. G. *et al.* Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, jun. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>.

RIBEIRO, L. A. O. *et al.* Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil (2009–2019): riscos, benefícios e alternativas. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 189–203, abr./jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.6784400>.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Version 4.3.3. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 30 jun. 2025.

ROSSI, C. A. de *et al.* Effects of sublethal doses of imidacloprid in Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 5, p. 552–558, maio 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jemt.22199>.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **CIIAGRO Online: Monitoramento Agrometeorológico**. Campinas: IAC, 2025. Disponível em: <http://www.ciiagro.sp.gov.br>. Acesso em: 9 abr. 2026.

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. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.). **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. Badajoz: Formatex, 2012. p. 696–703.

SKANDALIS, D. A.; ROY, C.; DARVEAU, C. A. Behavioural, morphological, and metabolic maturation of newly emerged adult workers of the bumblebee, *Bombus impatiens*. **Journal of Insect Physiology**, v. 57, p. 704–711, maio 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.02.001>.

SNODGRASS, R. E. **Anatomy and physiology of the honey bee**. New York: Comstock Publishing Associates, 1956.

TEETERS, B. S. *et al.* Sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony growth and activity at environmentally relevant concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 422–428, fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.1689>.

TOPPA, R. H. *et al.* Impact of glues used for RFIDs on the longevity and flight muscles of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, v. 52, p. 328–340, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00823-9>.

WILLIAMS, J. R.; SWALE, D. R.; ANDERSON, T. D. Comparative effects of technical-grade and formulated chlorantraniliprole to the survivorship and locomotor activity of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2582–2588, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.5832>.

WILLIAMSON, S. M.; WILLIS, S. J.; WRIGHT, G. A. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 8, p. 1409–1418, out. 2014.

ZHU, Q. *et al.* Disruption of peritrophic matrix chitin metabolism and gut immunity by chlorantraniliprole results in pathogenic bacterial infection in *Bombyx mori*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 193, p. 105430, jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105430>.

ZHANG, P.; EDGAR, B. A. Insect gut regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 14, n. 10, p. a040331, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040331>.

ANEXOS

Anexo I

ID	Espécie	Estágio	Classe do agrotóxico	Ingrediente ativo / Produto	Via de exposição	Regime	Ambiente	Parâmetro avaliado	País	Referência
1	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticida	Clotianidina	Oral	Crônico	Laboratório	Morfofisiologia/Mortalidade	Noruega	Arones <i>et al.</i> , 2021
2	<i>Bombus morio</i>	Adultas	Herbicida	Glifosato	Oral	Crônico	Laboratório	Morfofisiologia	Brasil	Abdalla <i>et al.</i> , 2016
3	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Acetamiprido, Clorpirifós e	Oral	Crônico	Laboratório	Morfofisiologia/Mortalidade	Espanha	Azpiazu <i>et al.</i> , 2023

				Oxamil				e		
4	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticida	Azadiractina	Oral	Agudo e crônico	Laboratório	Mortalidade e Comportamento	Bélgica	Barbosa <i>et al.</i> , 2015
5	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas e larvas	Fungicidas e Herbicidas	Glifosato, Clorotalonil, Azoxistrobina, Boscalida, entre outros	Oral e Contato	Agudo e Crônico	Laboratório e Semicampo	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	Estados Unidos	Belsky e Joshi, 2020
6	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas e Fungicidas	Misturas detectadas em pólen/néctar	Oral	Crônico	Campo	Mortalidade e Comportamento	Reino Unido	Botías <i>et al.</i> , 2017
7	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Imidacloprido	Oral	Agudo	Laboratório	Mortalidade e Morfofisiologia	Turquia	Çakici <i>et al.</i> , 2023
8	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Sulfoxaflor	Oral	Crônico	Laboratório	Mortalidade e Comportamento	Alemanha	Camp e Lehmann, 2021
9	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Imidacloprido	Oral	Crônico	Laboratório	Mortalidade e Comportamento	Itália	Cecchetto <i>et al.</i> , 2023
10	<i>Bombus terrestris</i> , <i>Bombus impatiens</i> , <i>Bombus ephippiatus</i>	Adultas	Inseticidas	Imidacloprido, Tiametoxam, Clotianidina, Acetamiprido e Tiacloprido	Oral e Contato	Agudo e Crônico	Laboratório e Campo	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	Reino Unido e Estados Unidos	Dennis e Gibbs, 2025
11	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Clorantraniliprol e, Flonicamida, Metaflumizona e Espirotriamato	Oral e Contato	Agudo e Crônico	Laboratório	Mortalidade e Comportamento	Canadá	Gradish <i>et al.</i> , 2009
12	<i>Bombus impatiens</i>	Adultas	Inseticidas	Flupiradifurona	Oral	Crônico	Laboratório	Mortalidade e Comportamento	Estados Unidos	Gray, Hulsey e Siviter, 2024
13	<i>Bombus lantschouensis</i> e <i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Flupiradifurona	Oral e Contato	Agudo e Crônico	Laboratório	Mortalidade e Comportamento	China	Jie <i>et al.</i> , 2025
14	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Herbicida	Glifosato	Oral	Agudo	Laboratório	Comportamento	Finlândia	Kaakinen <i>et al.</i> , 2024
15	<i>Bombus terrestris</i> e <i>Bombus impatiens</i>	Adultas	Inseticidas, Fungicidas e Herbicidas	Diversos	Oral	Crônico	Laboratório	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	Estados Unidos	Klinger <i>et al.</i> , 2019

16	<i>Bombus impatiens</i>	Adultas /Prole	Inseticidas	Dimetoato e Diflubenzurom	Oral	Crônico	Laboratório	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	Estados Unidos	Krueger <i>et al.</i> , 2021
17	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Imidacloprido	Oral	Crônico	Laboratório	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	Reino Unido	Laycock <i>et al.</i> , 2012
18	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Imidacloprido, Fipronil, Dimetoato, Deltametrina, Pirimicarbe, entre outros (26)	Oral e Contato	Agudo	Laboratório	Mortalidade	Itália	Marletto <i>et al.</i> , 2003
19	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas e Larvas	Inseticidas, Fungicidas e Herbicidas	Diversos	Oral e Contato	Agudo e Crônico	Laboratório e Estufas	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	Bélgica	Mommaerts e Smagghe, 2011
20	<i>Bombus terrestris</i>	Rainhas	Inseticida	Sulfoxaflor	Oral	Repetido	Laboratório	Mortalidade e Morfofisiologia	Reino Unido	Morrison <i>et al.</i> , 2025
21	<i>Bombus impatiens</i>	Adultas	Inseticidas	Tiametoxam, Sulfoxaflor, Flupiradifurona e Ciantraniliprole	Oral	Agudo	Laboratório	Mortalidade	Canadá	Mundy-Heisz <i>et al.</i> , 2022
22	<i>Bombus atratus</i>	Adultas	Inseticidas	Fipronil	Oral	Agudo	Laboratório	Morfofisiologia	Brasil	Provase <i>et al.</i> 2024
23	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Imidacloprido, Tiacloprido, Acetamiprido, Deltametrina, Tau-fluvalinato, Clorpirifós e Coumaphós	Oral e Contato	Agudo	Laboratório	Mortalidade e Morfofisiologia	Reino Unido e Alemanha	Reid <i>et al.</i> 2020
24	<i>Bombus impatiens</i>	Adultas	Inseticidas	Flupiradifurona	Oral	Crônico	Laboratório, Semi-campo	Mortalidade e Morfofisiologia	Estados Unidos	Richardson <i>et al.</i> 2024
25	<i>Bombus impatiens</i>	Adultas /Larvas	Inseticidas	Flupiradifurona	Oral	Agudo e Crônico	Laboratório	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	Estados Unidos	Richardson <i>et al.</i> 2025

26	<i>Bombus spp.</i>	Rainhas	Inseticidas, Herbicidas e Fungicidas	22 agrotóxicos diferentes detectados	Contato	Crônico	Campo	Morfofisiologia	Canadá	Rondeau <i>et al.</i> , 2022
27	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas	Clorantraniliprole	Oral e Contato	Agudo e Crônico	Laboratório	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	Bélgica	Smaghe <i>et al.</i> , 2013
28	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Inseticidas, Herbicidas e Fungicidas	Clotianidina, Dimetoato, Tau-fluvalinato, 2,4-D, Propiconazol, Cádmio e Arsénio	Oral	Crônico	Laboratório	Mortalidade e Comportamento	Reino Unido	Spurgeon <i>et al.</i> , 2016
29	<i>Bombus impatiens</i>	Adultas	Inseticidas	Imidacloprido	Oral	Agudo	Laboratório e Estufa	Comportamento	Estados Unidos	Switzer e Combes, 2016
30	<i>Bombus terrestris</i>	Adultas	Fungicidas	Difenoconazol, Kresoxim-metil, Tiram e Trifloxistrobina	<i>in vitro</i>	Agudo	Laboratório	Morfofisiologia	Rússia e Estados Unidos	Syromyatnikov <i>et al.</i> , 2017
31	<i>Bombus terrestris</i>	Adultos e Larvas	Inseticida	Imidacloprido	Oral	Crônico	Laboratório	Mortalidade, Morfofisiologia e comportamento	França	Tasei <i>et al.</i> , 2000