

INGRID NAIARA GOMES

**BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO INDICAM EFEITOS DELETÉRIOS DE
AGROTÓXICOS SOBRE AS ABELHAS *Melipona capixaba* E *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

FLORESTAL
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal
de Viçosa - Câmpus Florestal

T

G633b
2017
Gomes, Ingrid Naiara, 1991-
Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de
agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* E *Apis mellifera*
/ Ingrid Naiara Gomes. – Florestal, MG, 2017.
vi, 51f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Helder Canto Resende.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.37-51.

1. Polinização - agrotóxicos. 2. Toxicologia. 3. *Melipona capixaba*. 4. *Apis mellifera*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários.
II. Título.

CDD 22 ed. 632.950

INGRID NAIARA GOMES

**BIOENSAIOS EM LABORATÓRIO INDICAM EFEITOS DELETÉRIOS DE
AGROTÓXICOS SOBRE AS ABELHAS *Melipona capixaba* E *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 21 de Fevereiro de 2017.

Lucio Antônio de Oliveira Campos

Ricardo Ribeiro de Castro Solar

Lessando Moreira Gontijo
(Coorientador)

Helder Canto Resende
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradecer através de palavras é apenas um pequeno gesto de reconhecer o trabalho, apoio e esforço de todos que colaboraram direta, ou indiretamente, para realização dessa dissertação. Vocês foram essenciais na concretização desse trabalho, para todos vocês a minha mais sincera gratidão.

Primeiramente agradeço a Deus por iluminar e guiar todos os meus passos e por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas. Agradeço toda minha família, mas em especial a minha avó (Maria), mãe (Márcia) e irmã (Larissa) por me incentivarem a buscar os meus sonhos, pelo carinho, compreensão e amor. Obrigada por me apoiarem e sempre acreditarem em mim, e por terem paciência comigo nos momentos difíceis. Ao Leandro, meu amor, que esteve junto a mim em todos os momentos, sempre me ajudando no que fosse preciso. Obrigada pelo incentivo, compreensão, amor e companheirismo durante todo esse período.

A todos os colegas do programa pelos momentos de convivência e alegria. A todos os amigos que contribuíram de forma essencial para realização desse trabalho. Agradeço em especial aos amigos Lucas e Kamilla por se fazerem tão presentes no período em que mais precisei, por me acompanharem nas viagens, nas coletas e nos experimentos, nossas prozas tornaram todo trabalho mais leve e agradável. Ao Gustavo, pelo companheirismo durante todo o período do curso, sempre disposto a ajudar no que fosse preciso. Ao Luís, Matheus e Larissa por me acompanharem nas coletas e/ou experimentos. À Renata que permitiu que eu a acompanhasse durante os seus experimentos me esclarecendo sempre com boa vontade todas as dúvidas referentes aos bioensaios de toxicidade. À Elisa pelos seus valiosos conselhos, por me escutar nos momentos difíceis e por me auxiliar com o programa sigmaplot.

A todos os funcionários da olericultura por sempre me receberem de forma tão carinhosa me auxiliando no que fosse preciso. Em especial ao Toninho pela ajuda na elaboração da torre de voo e pelas diversas ideias e contribuições para o trabalho e ao Léo por todos os ensinamentos da terra. Amei conhecer vocês! Aos técnicos Alexandre e Tarcísio por me cederem os materiais necessários para essa pesquisa. A todos os queridos e sinceros amigos que fiz no Espírito Santo. A todos os funcionários do Parque Estadual de Pedra azul. A todo pessoal do INCAPER, que me acolheram e receberam de braços

abertos no laboratório de entomologia, jamais esquecerei a hospitalidade de vocês, em especial Adimar, Jessica, Bismarque e Sirla, levarei vocês no coração.

Agradeço a todos os professores integrantes do programa de mestrado em Manejo e conservação de ecossistemas naturais e agrários, ao professor Marco Antônio de Oliveira pelo empréstimo da BOD, que foi essencial para conclusão desse trabalho. Ao professor Ricardo Ribeiro de Castro Solar da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG pela disponibilidade e ajuda essencial na estatística do trabalho.

Ao querido professor e orientador Helder Canto Resende, que me acompanhou desde a graduação me conduzindo para a pesquisa. Agradeço pela oportunidade concedida e confiança depositada no meu trabalho durante esses anos. Obrigada por despertar em mim a curiosidade e o amor sobre as abelhas. Obrigada pela amizade, por me acompanhar nas coletas, viagens e por dividir comigo tanta sabedoria.

Aos meus coorientadores, professor Lessando Moreira Gontijo pela disponibilidade em me atender durante todas as vezes que precisei, por transmitir as informações necessárias referentes aos bioensaios de toxicidade, pelo empréstimo de materiais e por me motivar durante esses dois anos de mestrado. Você é um excelente profissional, tenho uma enorme admiração por você. A professora Maria Augusta Lima Siqueira pela disponibilidade em me receber e tirar as minhas dúvidas todas as vezes que precisei. Ao pesquisador José Salazar Zanúncio Júnior por conceder as dependências do laboratório de entomologia do INCAPER me possibilitando realizar parte dos experimentos e pelas informações relacionadas ao uso de agrotóxicos na região serrana do Espírito Santo.

A Universidade Federal de Viçosa, Campus Florestal a Pós-Graduação em Manejo e conservação de ecossistemas naturais e agrários, ao coordenador do programa professor Eduardo Pereira Gusmão. A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pelo fornecimento de subsídios para a realização deste trabalho. Ao Lucas e Jessica secretários do programa de pós-graduação que sempre nós receberam bem para ajudar nas dúvidas e para resolver os problemas burocráticos. Por fim agradeço aos membros da banca por aceitarem nosso convite: Professores Lessando Moreira Gontijo, Lucio Antônio de Oliveira Campos e Ricardo Ribeiro de Castro Solar.

A todos vocês o meu mais sincero obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Importância ecológica e econômica da polinização por abelhas	3
2.2 Declínio dos polinizadores/abelhas e suas consequências para os ecossistemas....	4
2.3 Utilização de pesticidas e seu impacto para as abelhas	5
2.4 Pesquisas realizadas com a abelha <i>Melipona capixaba</i>	7
2.5 Inseticida Thiamethoxam.....	9
2.6 Fungicida Mancozeb	11
2.7 Herbicida Glifosato	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Agrotóxicos testados.....	14
3.2. Abelhas e tratamentos	15
3.3. Condução dos bioensaios.....	16
3.3.1. Bioensaios de Repelência	16
3.3.2. Bioensaios de toxicidade por contato	17
3.3.3. Bioensaios de toxicidade por ingestão	18
3.3.4. Bioensaios de voo	18
3.4. Análise estatística	19
4. RESULTADOS	19
4.1. Repelência.....	19
4.2. Sobrevivência das abelhas expostas por contato	20
4.3. Sobrevivência das abelhas expostas por ingestão	22
4.4. Comportamento de voo de abelhas expostas por contato	23
4.5. Comportamento de voo de abelhas expostas por ingestão	25
5. DISCUSSÃO.....	28
5.1 Consequências da ausência de repelência dos agrotóxicos thiamethoxam, mancozeb e glifosato para as abelhas <i>M. capixaba</i> e <i>A. mellifera</i>	28
5.2 Impacto dos agrotóxicos thiamethoxam, mancozeb e glifosato na sobrevivência de <i>M. capixaba</i> e <i>A. mellifera</i> expostas por contato e ingestão	29
5.3 Alterações no comportamento de voo das abelhas <i>M. capixaba</i> e <i>A. mellifera</i> expostas por contato e ingestão aos agrotóxicos thiamethoxam, mancozeb e glifosato	34
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

RESUMO

GOMES, Ingrid Naiara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* e *Apis mellifera*.** Orientador: Helder Canto Resende. Coorientadores: Lessando Moreira Gontijo, Maria Augusta Lima Siqueira e José Salazar Zanúncio Júnior.

A polinização é um dos serviços ecológicos essenciais para a manutenção de ambientes naturais e agrários. Dentre os polinizadores, as abelhas representam um grupo diverso que exerce papel fundamental nesse processo. O declínio das populações de abelhas tem sido relatado, sendo a utilização intensiva de agrotóxicos apontada como um dos principais fatores responsáveis por esse impacto. No Brasil, a espécie sem ferrão *Melipona capixaba* está ameaçada de extinção. Sua região de ocorrência é amplamente impactada pela presença de diversas culturas agrícolas e utilização de agrotóxicos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade dos agrotóxicos thiamethoxam, glifosato e mancozeb sobre operárias de *M. capixaba* e *Apis mellifera*. Foram realizados bioensaios de sobrevivência mediante exposição por contato e ingestão, em doses de campo e diluição desta dose a 1/10. As abelhas sobreviventes desses bioensaios foram submetidas ao teste de voo. Foram realizados também bioensaios de repelência. Nos bioensaios de sobrevivência as duas doses do inseticida thiamethoxam nas duas vias de exposição, e a dose de campo do herbicida glifosato na exposição por ingestão diminuíram a sobrevivência dos indivíduos de *M. capixaba* e *A. mellifera*. As duas doses do fungicida mancozeb diminuíram a sobrevivência apenas das abelhas *A. mellifera* expostas por contato, entretanto nos bioensaios de voo realizados com as sobreviventes dessa via de exposição, esses tratamentos causaram alterações na capacidade de voo das duas espécies. Na exposição por ingestão as doses de campo do herbicida glifosato causaram prejuízos no voo das duas espécies, assim como a dose de campo do fungicida, entretanto apenas para *A. mellifera*. Por fim foi verificada também uma ausência de repelência dos agrotóxicos testados para as duas espécies, possivelmente levando a uma alta exposição das operárias durante o forrageamento. Esses resultados sugerem que os três agrotóxicos testados causam impactos negativos na população da abelha ameaçada de extinção *M. capixaba* e para a espécie *A. mellifera*.

ABSTRACT

GOMES, Ingrid Naiara, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Assessment of the potential effects of pesticides on bees of the species *Melipona capixaba* and *Apis mellifera*.** Adviser: Helder Canto Resende. Co-advisers: Lessando Moreira Gontijo, Maria Augusta Lima Siqueira and José Salazar Zanúncio Júnior.

Pollination is one of the essential ecological services for the maintenance of natural and agrarian environments. Among the pollinators, bees represent a diverse group that plays a fundamental role in this process. The decline of bee populations has been reported, with the intensive use of pesticides being pointed as one of the main factors responsible for this impact. In Brazil, the stingless bee *Melipona capixaba* is threatened with extinction. Its region of occurrence is largely impacted by the presence of various agricultural crops and the use of agrochemicals. In this sense, the objective of this work was to evaluate the toxicity of the pesticides thiamethoxam, glyphosate and mancozeb on workers of *M. capixaba* and *Apis mellifera*. Survival bioassays were performed by contact and ingestion exposure at field doses and dilution of this dose to 1/10. The surviving bees of these bioassays were submitted to the flight test. Repellency bioassays were also performed. In the survival bioassays the two doses of the thiamethoxam insecticide in the two exposure routes, and the field dose of the herbicide glyphosate on ingestion exposure decreased the survival of the individuals of *M. capixaba* and *A. mellifera*. The two doses of the mancozeb fungicide decreased the survival of *A. mellifera* bees exposed by contact, however in the flight bioassays performed with the survivors of this route of exposure, these treatments caused changes in the flight capacity of both species. In the exposure by ingestion the field doses of the glyphosate herbicide caused losses in the flight of both species, as well as the field dose of the fungicide, only for *A. mellifera*. Finally, it was verified an absence of repellency of the pesticides tested for the two species, possibly leading to a high exposure of the workers during the foraging. These results suggest that the three pesticides tested have negative impacts on the population of the threatened stingless bee *M. capixaba* and on the *A. mellifera* species.

1. INTRODUÇÃO

A necessidade do controle de pragas agrícolas para aumento da produtividade de diversas culturas elevou o uso dos pesticidas nesses ambientes, causando uma maior exposição das abelhas a esses produtos (Carvalho, 2006). Como consequência, nos últimos anos vem aumentando a preocupação e as pesquisas relacionadas ao impacto de pesticidas sobre esses polinizadores (Brittain *et al.*, 2010; Desneux *et al.*, 2007; Thompson, 2003; Gill *et al.*, 2012). Tem sido demonstrado que o uso indiscriminado de agrotóxicos reduz drasticamente a população de abelhas, já que essas, ao visitarem as culturas podem ser afetadas tanto por contato quanto pela ingestão de alimentos contaminados (Brittain e Potts, 2011; Fairbrother *et al.*, 2014). Contudo, grande parte dessas pesquisas têm focado principalmente na espécie *A. mellifera* (Lima *et al.*, 2016). Segundo Lima e seus colaboradores (2016) de um total de 869 estudos sobre impacto de pesticidas em abelhas, apenas 2,3% foram realizados com abelhas sem ferrão, sendo 65,9% realizados com *A. mellifera*. Provavelmente pelo fato de se ter maior conhecimento sobre criação, manejo e serviços de polinização dessa espécie, uma vez que a importância econômica das abelhas nativas foi durante muito tempo negligenciada. Entretanto as abelhas nativas desempenham funções fundamentais na conservação da biodiversidade através de seus serviços de polinização (Devillers *et al.*, 2003). Além disso, as espécies de abelhas apresentam diferentes características da história de vida, podendo, apresentar respostas diferentes durante a exposição aos pesticidas, sendo possível que haja mais vulnerabilidade de umas em relação a outras espécies (Brittain e Potts, 2011). Portanto, a utilização de uma espécie modelo em estudos toxicológicos pode subestimar os impactos causados em outras espécies (Lima *et al.*, 2016). A grande diversidade de abelhas nativas no Brasil reforça a necessidade e a importância de avaliar a susceptibilidade desses organismos frente à exposição aos agrotóxicos, já que a utilização destes produtos vem sendo considerada como um dos principais promotores do declínio dos polinizadores (Kuldna *et al.*, 2009).

A espécie *Melipona capixaba* Moure e Camargo (1994) é uma abelha sem ferrão, endêmica das regiões de altitude do estado do Espírito Santo (Resende *et al.*, 2014). A utilização de agrotóxicos é possivelmente um fator que tem contribuído para o declínio da população dessa espécie, isso porque na sua região de ocorrência natural há extensas áreas com culturas que tradicionalmente utilizam diversos agrotóxicos para controle

químico de pragas. Algumas dessas culturas, como as pertencentes às famílias Solanaceae, Rutaceae, Rubiaceae, Myrtaceae e Perseae são utilizadas como fonte de recurso pela espécie *M. capixaba* o que aumenta a exposição das forrageiras em campo (Serra *et al.*, 2012). Apesar do risco de exposição aos agrotóxicos e do status de ameaça de *M. capixaba*, até onde é de nosso conhecimento, não existem estudos sobre o impacto desses produtos para a população dessa espécie, sendo esse o primeiro trabalho a verificar os danos de agrotóxicos sobre *M. capixaba*. Portanto, este trabalho oferece contribuição inédita para a compreensão dos impactos negativos de três dos agrotóxicos mais utilizados na área de ocorrência natural da abelha *M. capixaba*.

O inseticida thiamethoxam, pertencente à classe dos neonicotinóides, o fungicida mancozeb e o herbicida glifosato são agrotóxicos amplamente utilizados nas culturas próximas a regiões de ocorrência natural de *M. capixaba* (informação pessoal do pesquisador José Salazar Zanuncio Júnior, Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER). A produção mundial de neonicotinóides tem aumentado nos últimos anos, sendo esses os principais inseticidas relacionados com o declínio das abelhas (Blacquièrre *et al.*, 2012). Dentre os inseticidas neonicotinóides a molécula ativa thiamethoxam, vem sendo amplamente utilizada, tornando-se importante a avaliação de estudos ecotoxicológicos com esses produtos (Laycock *et al.*, 2014).

Os inseticidas são o principal foco dos estudos toxicológicos em abelhas (Blacquièrre *et al.*, 2012). No entanto, em campo as forrageiras estão expostas a outros produtos químicos como os fungicidas e herbicidas (Baylis, 2000; Gianessi, 2005; Schreinemachers e Prasnee, 2012). Portanto os possíveis impactos causados por esses produtos não devem ser negligenciados, pois mesmo não apresentando efeito letal esperado às abelhas, os herbicidas e fungicidas podem causar danos subletais como alterações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que também comprometem a longo prazo o desenvolvimento e sobrevivência da colônia (Bryden *et al.*, 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade dos agrotóxicos thiamethoxam, glifosato e mancozeb sobre *M. capixaba* e *Apis mellifera*. Mais especificamente buscou-se avaliar (i) a repelência dos agrotóxicos testados; (ii) a letalidade por contato e por ingestão e (iii) os efeitos subletais da exposição por contato e ingestão destes agrotóxicos através da alteração do padrão de voo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância ecológica e econômica da polinização por abelhas

Os serviços ecossistêmicos fornecidos pelo meio ambiente, incluindo a polinização, são fundamentais para a manutenção da vida na terra, contribuindo para o bem-estar humano de forma direta ou indireta (Constanza *et al.*, 1997). A polinização é fundamental para aumentar a variabilidade genética e garantir a reprodução de diversas espécies de angiospermas. Atualmente cerca de 90% das plantas são polinizadas por animais, (Ollerton *et al.*, 2011) sendo os insetos os principais organismos responsáveis por esse processo (Giannini *et al.*, 2014).

As interações entre plantas e polinizadores são benéficas para ambos devido a relação mutualística entre esses dois grupos (Giannini *et al.*, 2014). Em áreas naturais a formação dos frutos é uma fonte de recurso importante para diversas espécies de animais, o que contribui para manutenção desses ambientes (Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010). Portanto a conservação dos polinizadores é fundamental para manutenção da biodiversidade dos ecossistemas, uma vez que o declínio na população destes pode causar impactos negativos sobre outros organismos com os quais interagem (Kearns e Inouye, 1997).

Além de atuarem na manutenção dos ecossistemas naturais, os polinizadores também contribuem para o aumento da produtividade de diversas culturas (Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010). Dados levantados de 200 países demonstraram que 86 das culturas globais mais importantes dependem da polinização por animais enquanto apenas 28 não dependem (Klein *et al.*, 2007). Portanto, há uma íntima dependência dos seres humanos por este processo. Na diminuição ou ausência do serviço de polinização e declínio de seus polinizadores a dieta seria infinitamente empobrecida em termos nutricionais (Klein *et al.*, 2007).

Em relação aos aspectos econômicos a valoração deste serviço prestado pelos polinizadores gira em torno de 153 bilhões por ano, o equivalente a 9,5% do valor da produção agrícola mundial (Gallai *et al.* 2009). No Brasil um estudo recente estimando o valor econômico anual do serviço de polinização de 44 culturas mostrou que a contribuição dos polinizadores foi cerca de US\$ 12 bilhões. A produção anual dessas culturas dependentes da polinização foi de aproximadamente US\$ 45 bilhões. Logo, a polinização representa 30% do valor total econômico dessas culturas (Giannini *et al.*, 2015).

Uma pesquisa realizada por Giannini e colaboradores (2014) sobre interações entre polinizadores e culturas agrícolas no Brasil demonstrou que dentre as 321 espécies identificadas, 250 foram consideradas como polinizadoras. O grupo Hymenoptera representou uma parcela de 89% neste conjunto de dados, 77% destes eram espécies da família Apidae. Essa predominância das abelhas como principais polinizadoras dos ecossistemas pode ser explicada pela coevolução entre abelhas e angiospermas, o que originou diversas adaptações nas espécies de abelhas para coleta em flores, fazendo com que esse grupo necessitasse dos recursos florais fornecidos pelas plantas durante todo seu ciclo de vida (Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010).

2.2 Declínio dos polinizadores/abelhas e suas consequências para os ecossistemas

O declínio no número de polinizadores em diferentes lugares do mundo tem aumentado a preocupação sobre a conservação dos polinizadores, principalmente no que diz respeito às abelhas (Biesmeijer *et al.*, 2006; Kevan e Viana, 2003). A redução desse grupo terá consequências negativas para os ecossistemas, pois diminuirá também a comunidade de plantas dependentes da polinização por esses organismos, principalmente aquelas dependentes dos polinizadores especialistas, o que causará redução na produção de frutos em ambientes naturais, levando posteriormente a extinção de diversos animais que utilizam sementes, frutos ou plantas como recurso para construção de seus ninhos (Biesmeijer *et al.*, 2006; Kearns e Inouye, 1997). Além disso, a diminuição dos polinizadores pode intensificar o desmatamento, já que uma das soluções para se compensar a escassez de polinização e diminuição na produtividade das culturas dependentes de polinizadores é aumentar a área de plantio, o que também poderá contribuir de maneira significativa para acelerar as mudanças climáticas (Aizen *et al.*, 2009).

Em ambientes agrários a diminuição na produtividade e qualidade dos frutos terá consequências econômicas e nutricionais para os seres humanos, uma vez que nossa dieta será restrita a culturas pouco dependentes da polinização (Klein *et al.*, 2007). Outro dado que preocupa é que o cultivo de culturas agrícolas que dependem de polinizadores está crescendo mais rapidamente em relação às que não dependem (Imperatriz-Fonseca e Nunes-Silva, 2010).

Vários fatores relacionados à causa do declínio dos polinizadores têm sido levantados, sendo um deles o desmatamento que conseqüentemente leva a fragmentação

de habitats, afetando as populações de polinizadores pela diminuição de recursos alimentares e fonte de nidificação, uma vez que muitas espécies de abelhas fazem seu ninho em ocos de árvores. Outro fator é a introdução de espécies exóticas que competem pelos mesmos recursos que os polinizadores nativos e introdução de pragas, como por exemplo, ácaros parasitas de abelhas que podem levar a diminuição da população dessas (Kevan e Viana, 2003). Além disso, o uso intensivo de pesticidas tem sido apontado como uma das principais pressões sobre os polinizadores (Kuldna *et al.*, 2009).

2.3 Utilização de pesticidas e seu impacto sobre as abelhas

Pesticidas são cada vez mais utilizados para aumento da produtividade agrícola, nas últimas décadas a produção global de inseticidas aumentou e é esperado que dobre até 2050, já que a população também tende a crescer, aumentando proporcionalmente a demanda para produção de alimentos (Tilman *et al.*, 2001). Essa previsão sugere que os polinizadores serão cada vez mais expostos e afetados pelos pesticidas, assim como evidenciado por Mullin e colaboradores (2010) que detectaram 98 pesticidas em amostras de pólen, com até 31 pesticidas diferentes encontrados em uma única amostra.

As abelhas podem ser expostas aos agroquímicos durante sua aplicação por contato com os resíduos e através da ingestão de pólen e néctar contaminado durante a alimentação (Fairbrother *et al.*, 2014). Essa exposição pode causar efeitos letais diminuindo o número de abelhas em campo e consequentemente reduzindo a frequência de polinização em plantas dependentes desse processo (Brittain e Potts, 2011). As abelhas podem também apresentar efeitos subletais responsáveis por alterações comportamentais, morfológicas e fisiológicas nos indivíduos expostos, ao longo do tempo, esses efeitos poderão causar prejuízos para manutenção da colônia (Desneux *et al.*, 2007).

A maioria dos estudos ecotoxicológicos de pesticidas e seus efeitos letais e subletais são realizados com *A. mellifera* (Tomé *et al.*, 2015a). Apesar do evidente impacto causado, os efeitos detectados e a magnitude dos mesmos variam entre as espécies devido às diferentes história de vida e estratégias de forrageamento, o que exige estudos específicos com diferentes espécies de polinizadores (Mommaerts *et al.*, 2010; Sandrock *et al.*, 2014). Devido à importância ecológica, econômica e evidência no declínio das populações de abelhas nativas torna-se necessária a compreensão de como essas espécies de abelhas reagem e quais os possíveis impactos causados pela exposição dos principais agrotóxicos utilizados nos ecossistemas agrícolas (Biesjarmi e Slaa, 2011).

Dentre as abelhas nativas do Brasil, as espécies pertencentes a tribo Meliponini (abelhas sem ferrão) representam um grupo diverso de abelhas eusociais. A distribuição desse grupo ocorre em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Michener, 2007). Diversas plantas nativas e culturas na América Neotropical são polinizadas eficientemente pelas espécies pertencentes a esse grupo, evidenciando dessa forma a sua importância ecológica e econômica (Slaa *et al.*, 2006; Ramalho, *et al.*, 2004). Sendo assim são necessários estudos que abordem o impacto que os pesticidas podem representar para as populações dessas abelhas, assim como as consequências do declínio das populações dessas espécies (Tomé *et al.*, 2015).

A exposição de indivíduos adultos de *Melipona quadrifasciata* com o inseticida imidacloprid e com bioinseticida espinosade causaram alta mortalidade entre as abelhas submetidas aos testes de contaminação por alimentação, sendo que o espinosade apresentou maior toxicidade oral quando comparado ao imidacloprid. Além disso, imidacloprid também reduziu significativamente a taxa de respiração, o comportamento de movimento e voo. Já o espinosade prejudicou apenas o comportamento de voo (Tomé *et al.*, 2015a).

Outro estudo realizado por Tomé e colaboradores (2015b) com as abelhas nativas sem ferrão *Partamona helleri* e *Scaptotrigona xanthotrica* demonstrou que biopesticida espinosade apresentou alta toxicidade para essas espécies expostas por contato e ingestão. O bioinseticida azadiractina e o inseticida sintético clorantprilprole não causaram mortalidade significativa dessas abelhas nesse estudo, entretanto, prejudicaram o comportamento de voo das abelhas expostas possivelmente comprometendo a atividade de forrageio desses indivíduos em campo.

Além das abelhas adultas as larvas também podem ser afetadas pela alimentação de pólen e néctar contaminados, como demonstrado por Tomé e colaboradores (2012) que submeteram operárias de *Melipona quadrifasciata anthidioides* a dietas contendo diferentes doses de imidacloprid. Eles verificaram um alto nível de mortalidade e efeitos subletais causados pelo comprometimento de regiões do cérebro responsáveis por memória, aprendizado e mobilidade. Esses dados sugerem que abelhas contaminadas na fase de desenvolvimento, mesmo que sobrevivam, terão seu desempenho comprometido quando adultas colocando em risco a sobrevivência da colônia.

Esses resultados, associados à importância ecológica, econômica, possível maior vulnerabilidade desse grupo perante a exposição aos pesticidas, e ao fato de haver

espécies de abelhas sem ferrão na lista brasileira de espécies ameaçadas de extinção, enfatiza a necessidade e importância de realizar estudos ecotoxicológicos com espécies nativas de abelhas sem ferrão, a fim de avaliar o impacto dos agrotóxicos nesse grupo de polinizadores (Arena & Sgolastra, 2014; Brasil, 2014; Tomé *et al.*, 2015).

Dentro desse grupo diverso pode-se citar o gênero *Melipona*, que apresenta distribuição em regiões Neotropicais (Michener, 2007). As abelhas pertencentes a esse grupo estão intimamente ligadas a polinização de plantas nativas e de culturas agrícolas, como exemplo pode-se citar o tomate, pimentão, berinjela, citrus, café, morango (Del Sarto *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2012). Entretanto provavelmente polinizam muitas outras culturas que ainda não foram registrados na literatura, uma vez que pesquisas evidenciando criação de polinizadores nativos para polinização de culturas agrícolas ainda estão crescendo, pois não era reconhecida como uma prática rentável (Heard, 1999; Slaa *et al.*, 2006). Algumas espécies do gênero *Melipona* realizam polinização por vibração, sendo importantes para polinização efetiva de plantas nativas e culturas que apresentam anteras poricidas. Espécies abundantes como *A. mellifera* e *Trigona spinipes* não possuem esse tipo de comportamento apresentando baixa probabilidade de polinização destas plantas (Nunes-Silva *et al.*, 2010). Além da importância ecológica e econômica da polinização por esse grupo, estas abelhas também representam fonte de renda para diversas famílias pela exploração dos produtos apícolas (Cortopassi-Laurino *et al.*, 2006). Portanto é importante a adoção de estratégias que visem diminuir os impactos das populações desse gênero (Tomé *et al.*, 2015).

2.4 Pesquisas realizadas com a abelha *Melipona capixaba*

Melipona capixaba (Hymenoptera: Apidae), popularmente conhecida como “uruçu-negra” ou “uruçu-capixaba”, é uma espécie endêmica da Mata Atlântica brasileira com distribuição restrita a pequenas áreas remanescentes nas regiões montanhosas do Espírito Santo, com altitudes entre 800-1200m, temperaturas médias anuais entre 18-23°C, e cobertura vegetal do tipo Floresta Ombrófila Densa Montana ou Floresta Ombrófila Aberta Montana. Sua área de distribuição é inferior a 5.000Km², provavelmente a menor distribuição conhecida entre as abelhas sem ferrão (Resende *et al.*, 2014).

O bioma de ocorrência dessa espécie apresenta uma das faunas mais ricas em diversidade de espécies e está entre as cinco regiões do mundo que possuem o maior

número de espécies endêmicas (Myers et al., 2000). Portanto deve ser uma das áreas prioritárias ao se considerar a necessidade de preservação da biodiversidade.

Segundo Serra (2012), Luz e seus colaboradores (2011) as principais famílias visitadas por *M. capixaba* são plantas pertencentes às famílias Myrtaceae e Melastomataceae. Várias espécies de Myrtaceae e Melastomataceae apresentam flores com anteras poricidas, portanto para que ocorra a liberação dos grãos de pólen é necessário que seus polinizadores apresentem comportamento especializado (Ramalho *et al.*, 1989; Proença e Gibbs, 1994). A vibração realizada por músculos relacionados ao voo durante a polinização, está presente no gênero *Melipona* spp e ausente em várias outras espécies de abelhas, sendo esse um exemplo de especialização relacionada a polinização dessas plantas (Serra *et al.*, 2012).

Serra e seus colaboradores (2012) verificaram que nas amostras de pólen coletadas por *M. capixaba* havia uma predominância do gênero *Eucalyptus* spp. No entanto essa constatação pode ter ocorrido devido à existência de áreas de reflorestamento dessa planta perto das colônias utilizadas durante as coletas uma vez que esse gênero foi bem menos abundante nas amostras de determinados meses, sendo o pólen de espécies de plantas selvagens predominantes nessas épocas. Assim como relatado por Luz e seus colaboradores (2011), que descreveu a preferência de *M. capixaba* por pólen de plantas nativas quando distantes das áreas de reflorestamento de eucalipto. Além disso, *M. capixaba* também é visitante de algumas espécies de orquídeas (Resende *et al.*, 2008). Portanto a utilização desses recursos nativos por essa espécie corrobora a correlação entre a sobrevivência da colônia e a preservação da Mata Atlântica no local de sua ocorrência natural (Serra *et al.*, 2012).

O desmatamento e consequentemente a fragmentação do habitat original da *M. capixaba*, associado com sua distribuição limitada levou à sua inclusão, em 2003, na Lista de Espécies Brasileiras Ameaçadas de Extinção, na categoria Vulnerável (Brasil, 2003). Em 2014 essa espécie foi reclassificada na categoria Em Perigo (Brasil, 2014). Os fatores que contribuem para a fragmentação do seu habitat são expansão da silvicultura, pastagens, atividades agrícolas voltadas à olericultura, atividade mineral de extração de rochas e o uso de fogo para a derrubada da vegetação para posterior ocupação de culturas agrícolas (Cepemar, 2004; Pedeaq, 2008).

Além dos fatores citados acima, uma das ameaças que possivelmente colocam em risco a conservação da *M. capixaba* é a utilização de agrotóxicos. Na região de ocorrência

da espécie há extensas áreas com culturas de frutas e olerícolas, sendo a aplicação de agrotóxicos comum nessa região, incluindo culturas pertencentes às famílias solanaceae, rutaceae, rubiaceae, myrtaceae e perseae, utilizadas como fonte de recurso pela espécie *M. capixaba* (Serra *et al.*, 2012).

Apesar de alguns artigos demonstrarem os efeitos negativos dos agrotóxicos sobre as abelhas nativas (Tomé *et al.*, 2015a; Tomé *et al.*, 2015b; Tomé *et al.*, 2012; Del Sarto *et al.*, 2014; Jacob *et al.*, 2014; Soares *et al.*, 2015), até onde é de nosso conhecimento, não há nenhuma pesquisa sobre tal impacto nas populações de *M. capixaba*. Sendo assim, são necessários estudos sobre a tolerância dessa espécie frente ao uso dos agrotóxicos mais utilizados na sua área de ocorrência natural, visando diminuir os riscos de suas colônias e consequentemente proteger a população dessa espécie. O inseticida thiamethoxam, o fungicida mancozeb e o herbicida glifosato são exemplos de pesticidas muito utilizados nas culturas próximas a regiões de ocorrência natural de *M. capixaba* (informação pessoal do extensionista José Salazar Zanúncio Júnior – INCAPER). Além disso, o ingrediente ativo thiamethoxam tem sido verificado como um dos agrotóxicos com maior número de detecções em análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos (ANVISA, 2016). Conforme o próprio relatório da ANVISA destaca, o herbicida Glifosato não foi avaliado devido à exigência de metodologia de análise específica, mas é potencialmente um agente contaminador dos alimentos.

2.5 Inseticida Thiamethoxam

O inseticida thiamethoxam pertence à classe dos neonicotinóides, subclasse das tianicotinilas. Começou a ser comercializado a partir de 1998 e desde então tem sido muito utilizado. Dentre os neonicotinóides o thiamethoxam é o segundo inseticida mais vendido no mundo após o imidacloprid (Sandrock *et al.*, 2014). Assim como os outros neonicotinóides, a ascensão do thiamethoxam no mercado é explicada por determinadas características dos produtos pertencentes a essa classe, como atividade inseticida de largo espectro, baixas taxas de aplicação, alta absorção e translocação em plantas (Maienfisch *et al.*, 2001). O thiamethoxam é recomendado para controle de pragas iniciais, insetos sugadores e alguns mastigadores. Esse produto pode ser aplicado via pulverização foliar ou no sulco de plantio, esguicho no tronco da planta ou no solo, via água de irrigação, esguicho em mudas após transplantio, por imersão de mudas, e no tratamento de

sementes, variando o modo de aplicação de acordo com a cultura e o inseto alvo (Pereira, 2010).

De acordo com as especificações do fabricante, no Brasil os produtos comerciais contendo thiamethoxam são utilizados para controle de pragas em diversas culturas agrícolas como tomate, café, berinjela, pimentão entre outras. Já foi relato alta eficiência desse inseticida no controle do bicho-mineiro do cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) e para controle da *Frankliniella schultzei* Trybom (Thysanoptera: Thripidae) em culturas de tomate (Raetano *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2006).

No que diz respeito ao modo de ação, os inseticidas pertencentes a classe dos neonicotinóides são neurotóxicos, atuam na fenda sináptica no processo de transmissão do impulso imitando e competindo com o neurotransmissor acetilcolina pelos mesmos receptores. A exposição dos insetos a esses inseticidas causam hiperexcitabilidade do sistema nervoso central devido à transmissão contínua de impulsos nervosos. Isso ocorre porque a ligação entre os neonicotinóides e os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) é irreversível, pois a enzima acetilcolinesterase não realiza a quebra para interromper a transmissão do impulso nervoso. A exposição das abelhas a esses inseticidas causam sintomas como tremores, colapso do sistema nervoso e morte (Matsuda *et al.*, 2001; Van der Sluijs *et al.*, 2013).

Além disso, uma vez que o thiamethoxam tenha sido incorporado aos tecidos das plantas ou dos insetos ele se transforma em um precursor do clotianidina, outro neonicotinóide, cuja ação se assemelha à do imidacloprid, agindo no mesmo receptor que este (Nauen *et al.*, 2003). O imidacloprid apresenta alta toxicidade levando a efeitos letais e subletais para população de espécies de abelhas manejadas e nativas (Blacquiére *et al.*, 2012; Tomé *et al.*, 2012).

O inseticida thiamethoxam é altamente lixiviável. A contaminação de recursos hídricos com esses resíduos constituem uma preocupante forma de poluição ambiental causada por pesticidas, uma vez que pode afetar organismos não-alvo expostos aos resíduos desses produtos (Rigitano *et al.*, 2008). Os produtos pertencentes ao grupo dos neonicotinóides são da classe dos inseticidas sistêmicos, ou seja, quando utilizados em preparações de sementes e adições direta no solo são distribuídos pelos tecidos das plantas, consequentemente podendo deixar resíduos no pólen e néctar (Blacquiére *et al.*, 2012; Henry *et al.*, 2012; Stoner e Eitzer, 2012). Um estudo realizado por Tapparo e seus

colaboradores (2011) indicou que as sementes de plantas revestidas com thiamethoxam, após seu desenvolvimento, apresentaram soluções (gutação) que continham altos níveis do produto utilizado. Esses fatores representam uma ameaça para as abelhas, uma vez que aumentam a exposição das operárias, durante o forrageio (Brittain e Potts, 2011; Fairbrother *et al.*, 2014). Um estudo de resíduo em amostra de mel encontrou 19 pesticidas diferentes dentre eles o thiamethoxam. Os níveis dos resíduos encontrados de thiamethoxam foi suficientemente alto podendo causar efeitos adversos para as abelhas (Silva *et al.*, 2015).

Como já relatado por Laycock e seus colaboradores (2014) os recentes estudos sobre impacto dos neonicotinóides sobre abelhas tem como foco maior o imidacloprid, talvez pelo fato desse produto ter sido identificado publicamente como uma ameaça potencial para as populações de abelhas. Entretanto os produtores têm utilizado cada vez mais outros produtos como o thiamethoxam para suas culturas, além disso, esse produto é frequentemente aplicado em culturas visitadas por abelhas sem ferrão (Rosa *et al.*, 2016). A exposição de operárias de *A. mellifera* a doses do inseticida thiamethoxam causou alta mortalidade nas abelhas avaliadas, além de comprometer o forrageamento das abelhas durante o experimento, com possíveis contribuições para risco de colapso dessa espécie (Henry *et al.*, 2012). Portanto as populações de abelhas estão cada vez mais expostas a esses outros neonicotinóides, sendo necessário o conhecimento do impacto desses produtos para as espécies pertencentes a esse grupo. (Laycock *et al.*, 2014).

2.6 Fungicida Mancozeb

Além dos inseticidas as abelhas estão expostas também a outros produtos químicos agrícolas como os fungicidas e herbicidas (Charlton e Jones, 2007). O fungicida Mancozeb pertence ao grupo dos etilenobisditiocarbamatos (EDBC) e subclasse dos ditiocarbamato. Desde a época de seu lançamento, em 1944, esse produto tem sido amplamente utilizado, devido a sua alta eficiência no combate de diversos fungos causadores de fitopatologias, baixa toxicidade aguda e persistência no meio ambiente, sendo muito utilizado em lavouras para proteção de frutas, vegetais e árvores ornamentais (Calviello *et al.*, 2006).

De forma geral os produtos pertencentes à classe dos EDBC, são fungicidas de contato, eles atuam como inibidores multi-sítio no patógeno inativando enzimas e levando a uma interrupção geral do metabolismo e integridade celular. Formam também uma

barreira na superfície da planta prevenindo a penetração do fungo no tecido vegetal (Gisi e Sierotzki, 2008).

Dentre os pesticidas, os fungicidas são os mais encontrados em produtos apícolas como, por exemplo, a cera e o própolis (Mullin *et al.*, 2010). Isso pode ser explicado pelo fato de que os fungicidas podem ser aplicados durante a floração, período em que as abelhas forrageiam em busca dos recursos florais (Johnson *et al.*, 2013). A presença desse resíduo pode inibir a abundância, diversidade e crescimento de determinados microrganismos benéficos responsáveis pela fermentação natural do pólen, comprometendo dessa forma a alimentação das abelhas e consequentemente a sobrevivência das colônias (Yoder *et al.*, 2013).

Em ecossistemas agrícolas as abelhas forrageiras estão expostas a diversos defensivos agrícolas aplicados próximos a sua área de ocorrência havendo relatos do impacto dos efeitos sinérgicos dos fungicidas com outros pesticidas, o que leva a um aumento na toxicidade destes produtos para organismos não-alvo (Sanchez-Bayo e Goka, 2014; Biddinger *et al.*, 2013; Pilling e Jepson, 1993).

Um recente estudo demonstrou que a exposição das abelhas solitárias *Osmia lignaria* e *Megachile rotundata* aos fungicidas roval e pristine apresentou efeito subletal comprometendo o reconhecimento do ninho dessas duas espécies. A evidência de desorientação no local do ninho, relatada, indica uma possível perda de memória e capacidade sensorial dessas abelhas expostas aos fungicidas testados (Artz e Pitts-singer *et al.*, 2015). Portanto é importante realizar estudos que avaliem os possíveis impactos causados por fungicidas para as abelhas.

2.7 Herbicida Glifosato

O herbicida glifosato apresenta alta eficiência na eliminação de ervas daninhas, por esse motivo vem sendo amplamente utilizado por diversos produtores em ecossistemas agrários e em áreas não cultivadas desde que foi introduzido no mercado, em meados de 1970 (Rueppel *et al.*, 1977). O glifosato funciona como herbicida não seletivo, sistêmico, pós-emergente. Dentre os pesticidas não seletivos, 60% dos agroquímicos comercializados no mercado mundial são produtos contendo glifosato, gerando aproximadamente US\$ 1,2 bilhão por ano através das vendas desses produtos (Junior e Santos, 2002). No Brasil esse herbicida representa 30% do volume total de todos os pesticidas utilizados no país, sendo consumido anualmente 150 milhões de litros desse

produto, sendo um dos pesticidas mais utilizados em todo o mundo (Toni *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011).

Os produtores utilizam o glifosato em diversas culturas como, por exemplo, nos cultivos de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, soja, fumo, uva, soqueira em cana-de-açúcar, ameixa, banana, cacau, nectarina, pêra, pêssego, seringueira, algodão e em pastagens, com a finalidade de controlar as plantas daninhas próximas às áreas dessas cultivares (Junior e Santos, 2002).

A absorção do glifosato pelas plantas ocorre através das folhas e dos caulículos novos, posteriormente ocorre o transporte do produto para as outras partes das plantas onde este age na inibição enzimática das plantas, através da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs). Essa enzima é responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, tirosina e triptofano), que são precursores de outros produtos, como lignina, alcaloides, flavonoides e ácidos benzoicos. Essa ação faz com que as plantas morram poucos dias ou semanas após a aplicação do produto, não havendo sobrevivência de nenhuma parte da planta devido ao transporte por todo o sistema (Toni *et al.*, 2006)

Apesar de ser reconhecido como um produto de baixa toxicidade há evidências de impacto pela utilização de glifosato no meio ambiente. Primeiramente devido ao uso prolongado do produto que resulta na resistência de algumas espécies de plantas daninhas (Junior e Santos, 2002). Além disso, por não ser metabolizado pela planta, praticamente toda a concentração do ingrediente ativo aplicado é encontrado na sua forma original (Toni *et al.*, 2006). Portanto esse herbicida pode permanecer nas culturas após a aplicação por longos períodos podendo ser encontrado também em áreas próximo ao cultivo e em animais utilizados para alimentação humana (Junior e Santos, 2002; Zhang *et al.*, 2011).

Apesar da baixa toxicidade relatada para animais, a introdução de culturas transgênicas resistentes ao glifosato tem aumentado cada vez mais a aplicação desse herbicida em áreas agrícolas podendo ter consequências para diversos organismos dentre eles as abelhas (Toledo e Guillén, 2014). Os estudos que avaliam a toxicidade de herbicidas assim como seus efeitos subletais no comportamento de abelhas são recentes e ainda poucos, sendo necessária a continuidade dessas pesquisas a fim de compreender qual impacto desses agroquímicos para as espécies de abelhas próximas a ambientes agrícolas (Balbuena *et al.*, 2015; Herbert *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2014).

A aplicação intensiva desse produto em culturas geneticamente modificadas com resistência ao glifosato pode atingir plantas não-alvo próximas aos campos de cultivo (Nicholls e Altieri, 2012). Como consequência ocorre redução da diversidade e abundância dos recursos utilizados pelas abelhas. A má nutrição é um dos fatores responsáveis pelo declínio desses organismos. Portanto práticas agrícolas que proporcionem maior diversidade de pólen são indispensáveis para conservação de várias espécies de abelhas. (Schmidt *et al.*, 1995).

Após ou durante a aplicação do produto as abelhas podem se contaminar ao entrar em contato ou ao coletarem recursos como água e alimentos contaminados durante o forrageio. Esse herbicida é muito solúvel em água e pode permanecer por um longo período nas culturas, após sua aplicação, e também ser encontrado em áreas próximo ao cultivo (Zhang *et al.*, 2011), o que aumenta a exposição podendo causar efeitos subletais ainda pouco documentados na literatura (Toledo e Guillén, 2014).

No estudo realizado por Toledo e Guillén (2014) foi observado que não houve diferença significativa na mortalidade a curto prazo entre as espécies *A. mellifera* e *Tetragonisca angustula* expostas oralmente com concentrações de glifosato e o controle contendo apenas o alimento puro. Entretanto foi observado que as abelhas que se alimentaram de mais da metade da solução contaminada com o agrotóxico morriam mais rápido do que as abelhas alimentadas somente com a solução do controle.

A exposição oral de *A. mellifera* a doses de glifosato produziu sensibilidade sensorial e déficits cognitivos em operárias dessa espécie (Hebert *et al.*, 2014). Além disso, um recente estudo de exposição de três doses subletais demonstrou que as operárias de *A. mellifera* que se alimentaram de doses mais altas de glifosato tiveram a sua trajetória de voo, de volta para a colmeia, alterada, indicando interferência na capacidade cognitiva dessa espécie (Balbuena *et al.*, 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Agrotóxicos testados

Para definir os agrotóxicos a serem testados foram selecionados um inseticida, um herbicida e um fungicida dentre os mais frequentemente aplicados nas culturas mais comuns nos municípios de ocorrência natural da espécie *M. capixaba*. Não foi possível verificar dados oficiais com estatísticas de uso de agrotóxicos para a região. Com a

colaboração de técnicos e extensionistas rurais do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), verificou-se que dentre os agrotóxicos aplicados nas culturas da região, destaca-se pela alta frequência de aplicação o inseticida thiamethoxam (actara[®]), o herbicida glifosato (roundup[®]) e o fungicida mancozeb (manzate[®]), sendo, portanto, definidas essas formulações comerciais para realização dos testes.

3.2. Abelhas e tratamentos

Foi testada a tolerância de operárias adultas de *M. capixaba* e *A. mellifera* aos agrotóxicos selecionados. Os testes foram realizados com *M. capixaba* devido ao seu status de ameaçada de extinção, e comparativamente com *A. mellifera*, por ser uma espécie, apesar de exótica, amplamente distribuída e manejada na região, e também para permitir a comparação com outros estudos conduzidos com a espécie. Os bioensaios realizados foram: toxicidade por contato, toxicidade por ingestão, teste de voo e repelência. Os dois primeiros testes avaliaram a sobrevivência das abelhas expostas aos agrotóxicos mediante essas duas vias de exposição e os dois últimos testes foram realizados para avaliar a possível influência dos produtos no comportamento dos indivíduos das duas espécies.

Foram utilizadas cinco colônias de *M. capixaba* e cinco colônias de *A. mellifera*. As operárias adultas dessas espécies foram coletadas utilizando-se potes de plástico de 500 mL (15 × 15 × 10 cm), com furos na tampa para a circulação de ar. Após a coleta, as abelhas foram levadas para o laboratório e mantidas em um ambiente com temperatura e humidade controlada a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa $65 \pm 5\%$ conforme Del Sarto e colaboradores (2014).

Foram definidas duas doses para exposição de contato e ingestão, a dose máxima recomendada para uso em campo (AGROFIT, 2016) e recomendações do fabricante, e a diluição a 10% dessa dose (1/10 da dose campo) para cada agrotóxico (Costa *et al.*, 2013; Fernandes, 2012). Como referência, utilizou-se a dose comercial indicada pelo fabricante no rótulo de cada produto para combate das seguintes pragas: 20g de thiamethoxam (actara[®]) em 100L de água para aplicação na cultura de tomate para combate da mosca branca; 250 g em 100L de água de mancozeb (manzate[®]) para cultura de citros para combater a praga ácaro da falsa ferrugem e 1750g em 100L de água de glifosato (roundup[®]) para controle da Trapoeraba *Commelina bengalensis* (AGROFIT, 2016). As

doses de campo de referência foram selecionadas conforme as culturas agrícolas e as aplicações mais comuns na região (conforme dados do INCAPER) e pelo potencial forrageamento de *M. capixaba* nesses cultivos, conforme dados de Serra e colaboradores (2012).

Dessa forma, a dose de campo do produto comercial de cada agrotóxico foi definida nas concentrações de 0,2g/L do inseticida thiamethoxam, 2,5g/L do fungicida mancozeb e 17,5g/L do herbicida glifosato. A dose de campo foi selecionada para representar um cenário real de exposição nos testes de repelência, exposição por contato, ingestão e voo. Uma concentração mais baixa desses produtos foi utilizada para analisar se as mesmas podem interferir na sobrevivência das abelhas expostas por ingestão e contato ou no comportamento do voo de *M. capixaba* e *A. mellifera*. Neste caso, definiu-se uma diluição 1:10 (diluição 10X) da dose de campo.

3.3. Condução dos bioensaios

3.3.1. Bioensaios de Repelência

Os bioensaios de repelência foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Barbosa e seus colaboradores (2014). Foram coletadas operárias adultas para avaliar o efeito repelente dos três agrotóxicos para as espécies *M. capixaba* e *A. mellifera*. Foram considerados quatro tratamentos: controle – xarope puro (água: açúcar 1:1); dose de campo de thiamethoxam (0,2g/L); dose de campo de mancozeb (2,5g/L) e dose de campo de glifosato (17,5g/L), diluídos em xarope (alimento contaminado). Para cada tratamento foi utilizado um total de 100 abelhas coletadas de 5 colônias. Após a coleta as abelhas foram mantidas sem alimentação por aproximadamente 1 hora em um pote de plástico (15 × 15 × 10 cm) em estufa com condições de temperatura e umidade controlada (28 ± 2°C e umidade relativa 65 ± 5%). Após esse período, cada abelha foi transferida individualmente para um tubo de ensaio (2 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento) contendo 5 µL de cada tratamento. As soluções foram colocadas no fundo de cada recipiente e mantidas na posição horizontal. Uma fonte de luz foi fornecida na parte inferior dos tubos de ensaio para atrair as abelhas no sentido da solução. Os tubos foram fechados com um tecido e elásticos para impedir a fuga das abelhas e a exposição foi mantida durante 5 minutos. Após a exposição aos tratamentos e ao controle, cada abelha foi transferida para outro tubo de ensaio contendo 5 µL do alimento puro (água com açúcar 1:1), durante 5 minutos. As abelhas foram consideradas repelidas quando não se

alimentarem do xarope contaminado, porém posteriormente se alimentaram do xarope puro. As abelhas que não se alimentaram da solução pura nem tratada não entraram como dados, admitido-se que elas não se alimentaram por outro motivo (Barbosa *et al.*, 2014). O experimento foi realizado em um quarto escuro sendo verificada a temperatura e umidade relativa ambiente durante o trabalho, com auxílio de um datalog.

3.3.2. Bioensaios de toxicidade por contato

O teste de toxicidade por contato foi executado de acordo com Del Sarto *et al.* (2014), com modificações. Foram testados os três agrotóxicos em 7 tratamentos: T1 –controle; T2 - dose de campo de glifosato (17,5g/L); T3 - dose diluída 1/10 de glifosato (1,75g/L); T4 - dose de campo de mancozeb (2,5g/L); T5 - dose diluída 1/10 de mancozeb (0,25 g/L); T6 - dose de campo de thiamethoxam (0,2g/L) e T7 - dose diluída 1/10 de thiamethoxam (0,02g/L). O controle consistiu em água deionizada pura, sem adição de agrotóxico. Para esse bioensaio foram utilizadas um total de 60 abelhas por tratamento, coletadas de cinco colônias de cada espécie. Este bioensaio foi realizado em placa de Petri (60x120 mm), cada uma contendo um indivíduo adulto. Foi pulverizado, com auxílio de um borrifador, 750 µL das soluções de cada tratamento em papel filtro de modo a cobrir toda superfície. Após a aplicação os papéis foram secos durante 30 minutos em temperatura ambiente. Estes papéis foram utilizados para cobrir o fundo das placas de Petri onde cada abelha foi transferida individualmente. No controle, as placas foram tratadas apenas com água pulverizada sobre toda a superfície do fundo da placa, deixando-se secar por 30 minutos em temperatura ambiente. Em cada placa foi fornecida 100 µL de alimento (xarope de água/açúcar 1:1). As placas de Petri deste teste foram mantidas em estufa a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa $65 \pm 5\%$ para as duas espécies durante todo o experimento (24 horas). Após três horas de contato com os produtos as abelhas foram transferidas para placas limpas de acordo com Pereira (2016), uma vez que em campo as abelhas não forrageiam durante todo o período do dia. Durante o experimento, a mortalidade foi contabilizada em 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas após a aplicação dos tratamentos. Essas abelhas foram mantidas nas placas durante todo experimento, sendo fornecido o alimento durante esse período. A cada avaliação as abelhas foram estimuladas com um pincel a fim de realmente comprovar a mortalidade do indivíduo. Foram consideradas mortas as abelhas que se mostraram incapazes de locomover após estímulos mecânicos. As abelhas sobreviventes nesse teste foram utilizadas nos bioensaios de voo.

3.3.3. Bioensaios de toxicidade por ingestão

O teste de toxicidade por ingestão foi executado de acordo com a metodologia Costa *et al.* (2013), com modificações. Foram utilizados os mesmos tratamentos do bioensaio de toxicidade por contato. As doses de agrotóxico foram fornecidas diluídas em xarope (água:açúcar 1:1). Para o controle foi oferecido apenas o xarope puro. Esse bioensaio foi realizado em placas de Petri (60x120 mm), em cada uma foi adicionado 60 microlitros de solução referente a cada tratamento diretamente na placa, sendo verificada a alimentação de cada abelha após entrar em contato com alimento. Após a coleta as abelhas foram mantidas sem alimento por aproximadamente 1 hora e posteriormente individualizadas nas placas contendo os tratamentos e mantidas por 24 horas em estufa a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa $65 \pm 5\%$ para as duas espécies durante todo o experimento (Del Sarto *et al.*, 2014). Após três horas as abelhas foram transferidas para placas contendo apenas alimento puro (Pereira, 2016). A mortalidade foi contabilizada em 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas após a montagem dos bioensaios. Foram consideradas mortas às abelhas que se mostraram incapazes de locomover após estímulos mecânicos. As abelhas sobreviventes nesse teste foram submetidas aos bioensaios de voo.

3.3.4. Bioensaios de voo

O teste de voo foi executado de acordo com a metodologia descrita por Tomé e seus colaboradores (2015). Esse bioensaio foi realizado com as abelhas sobreviventes dos experimentos de contato e ingestão para as duas espécies. O experimento foi conduzido em um quarto escuro. Para avaliar o voo após a exposição com as diferentes doses dos agrotóxicos, todas as abelhas sobreviventes foram soltas, uma por vez, na base de uma torre de voo (0,35 m x 0,35 m de largura e 130cm de altura) com uma luminária ligada em sua parte superior. A torre de voo apresenta cinco níveis de altura: 0, 1, 2, 3 e 4. O nível zero indicou que não ocorreu voo, ou seja, a abelha permaneceu na base da torre. O nível um que as abelhas voaram até 40 cm de altura. O nível dois que elas voaram entre 41 e 80 cm. O nível três que o voo foi entre 71 e 120 cm de altura e por último o nível 4 se as abelhas conseguiram chegar à fonte de luz a uma altura de 130 cm. Foi estipulado o tempo de um minuto (contabilizado em um cronômetro) para analisar em qual nível máximo as abelhas conseguiram chegar. Além disso, foram registrados os segundos com que as abelhas conseguiram alcançar o seu nível máximo.

3.4. Análise estatística

Para os dados de repelência foi realizado um modelo logístico, com distribuição binomial, sendo repelência o estado 1 (no qual as abelhas não se alimentam da solução contaminada, mas posteriormente consomem o controle) e não repelência o estado 0 (quando as abelhas consomem o alimento contaminado e se alimentam ou não do controle). Para analisar o efeito do tratamento na altura alcançada na torre e no tempo de chegada à torre no teste de voo, foi utilizada análise de variância, onde altura na torre e tempo foram variáveis respostas e tratamento a variável explicativa. Para estes testes, foram utilizados modelos mistos, sendo a colônia considerada como efeito aleatório e significância pelo qui quadrado de Wald (1943) e posterior teste Tukey (1953) para comparações entre as médias dos níveis do tratamento. Os dados de mortalidade por tempo (sobrevivência) foram submetidos as análises de sobrevivência utilizando estimadores Kaplan-Meier para obter as curvas de sobrevivência (PROC LIFETEST) (SAS Institute 2008). A similaridade geral entre as curvas de sobrevivência foi testada pelo teste não paramétrico χ^2 Log-Rank. O nível de significância em todos os casos foi de 5%. As análises de sobrevivência foram realizadas no software SAS (SAS Institute 2008), e o restante das análises foram realizadas no software R (R Core Team 2016). Os gráficos foram realizados utilizando o programa SigmaPlot® versão 11.0.

4. RESULTADOS

4.1. Repelência:

O teste estatístico indicou que não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à proporção de indivíduos repelidos e não repelidos para a espécie *M. capixaba* ($\chi^2 = 0,8982$, g.l = 3 e $p = 0,8259$) e *A. mellifera* ($\chi^2 = 0,0059$, g.l = 3 e $p = 0,9999$). Observou-se que 90% das abelhas das duas espécies em todos os tratamentos se alimentaram dos tratamentos contendo agrotóxicos, confirmando assim ausência de efeito repelente (Fig. 1).

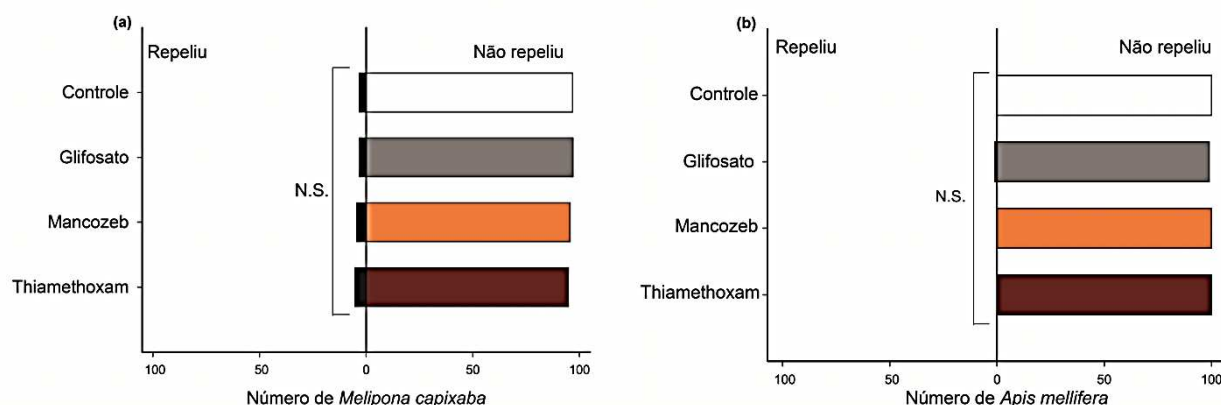


Fig. 1 Repelência de cada tratamento para as espécies *M. capixaba* (a) e *A. mellifera* (b) após a exposição aos agrotóxicos thiamethoxam (inseticida, [0,2g/L]), mancozeb (fungicida, [2,5g/L]) e glifosato (herbicida, [17,5g/L]). O lado esquerdo do gráfico indica o número de abelhas repelidas. O lado direito indica o número de abelhas que não foram repelidas.

4.2. Sobrevivência das abelhas expostas por contato

Para o bioensaio de sobrevivência após contato o teste estatístico indicou que houve diferença significativa entre os tratamentos para as espécies *M. capixaba* (Log-Rank $\chi^2 = 538.0275$, g.l.= 6, $p < 0,001$) e *A. mellifera* (Log-Rank $\chi^2 = 147.4376$, g.l.= 6, $p < 0,001$). Nessa via de exposição as duas doses do inseticida thiamethoxam causaram alta mortalidade para *M. capixaba* (dose campo: 100%; 1/10 da dose de campo: 68%) e para *A. mellifera* (dose campo: 80%; 1/10 da dose de campo: 57%). As duas doses do fungicida mancozeb causaram mortalidade intermediária para *A. mellifera* (dose campo: 52%; 1/10 da dose de campo: 37%), entretanto para *M. capixaba* essa mortalidade foi baixa (dose campo: 3%; 1/10 da dose de campo: 8%). As duas doses de glifosato causaram baixa mortalidade para *M. capixaba* (dose campo: 8%; 1/10 da dose de campo: 7%) e *A. mellifera* (dose campo: 17%; 1/10 da dose de campo: 13%) semelhante ao controle com 7% e 8% de mortalidade para *M. capixaba* e *A. mellifera* respectivamente (Fig. 2).

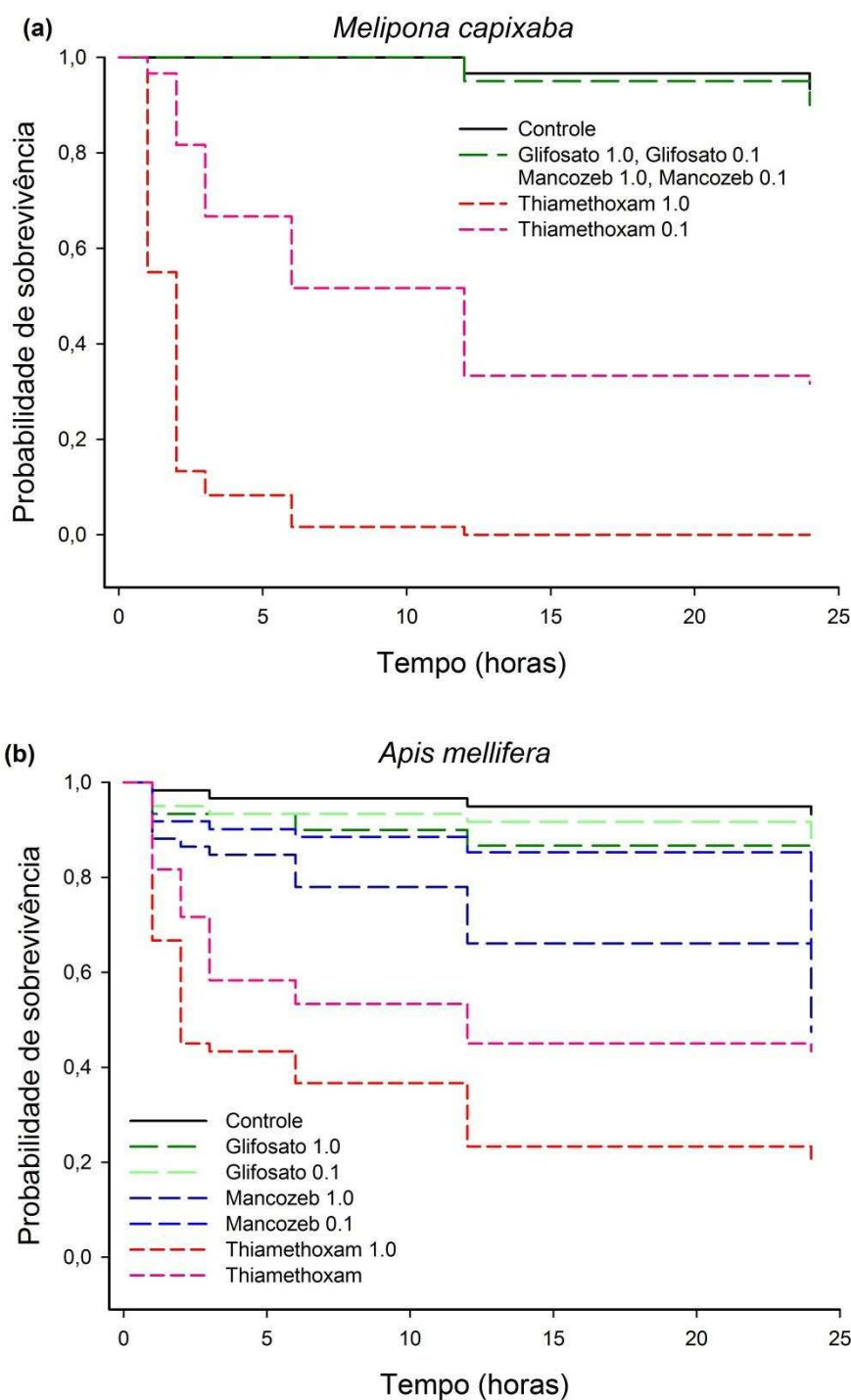
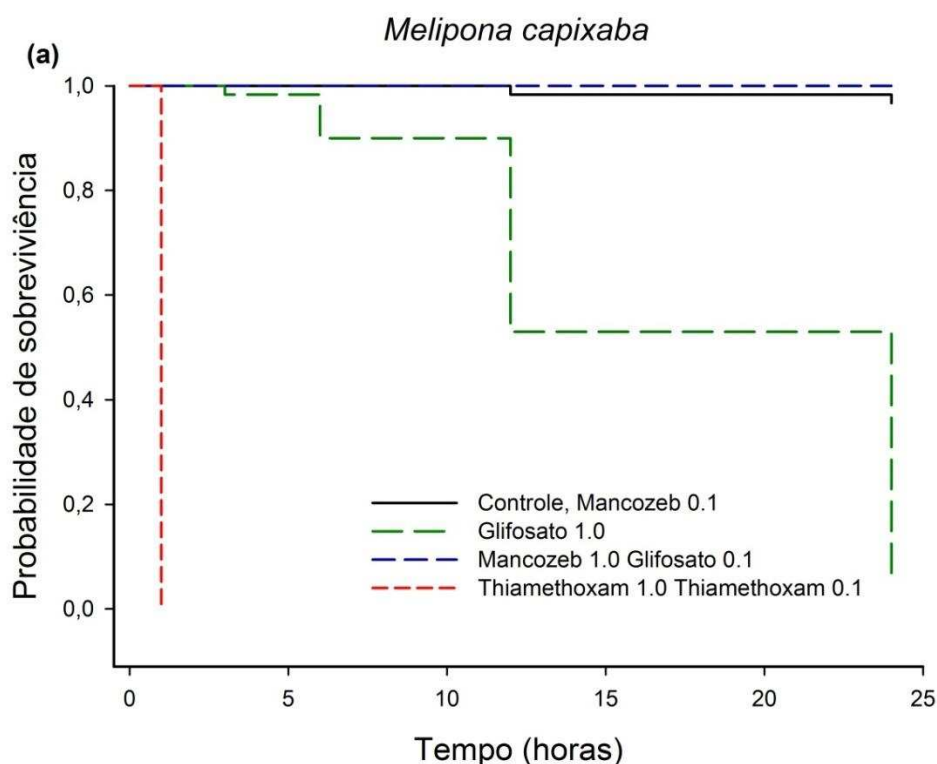


Fig. 2 Curvas de sobrevivência de operárias adultas da abelha *M. capixaba* (a) e *A. mellifera* (b) expostas por contato aos tratamentos: T1 – controle; T2 dose de campo de glifosato (17,5g/L); T3 – dose diluída 1/10 de glifosato (1,75g/L); T4 – dose de campo de mancozeb (2,5g/L); T5 – dose diluída 1/10 de mancozeb (0,25 g/L); T6 – dose de campo de thiamethoxam (0,2g/L) e T7 – dose diluída 1/10 de thiamethoxam (0,02g/L). O eixo x representa o tempo em horas e o eixo y a probabilidade de sobrevivência.

4.3. Sobrevivência das abelhas expostas por ingestão

A análise de sobrevivência para abelhas expostas por ingestão aos agrotóxicos testados mostrou diferença significativa entre os tratamentos para as espécies *M. capixaba* (Log-Rank $\chi^2=551.3536$, g.l.= 6, $p < 0,001$) e *A. mellifera* (Log-Rank $\chi^2 = 483.5914$, g.l.= 6, $p < 0,001$). Dentre os tratamentos, as duas doses do inseticida thiamethoxam causaram 100% de mortalidade dos indivíduos de *M. capixaba* e *A. mellifera*, o que aconteceu de minutos a poucas horas após a ingestão (Fig.3). A dose de campo do herbicida glifosato também causou alta mortalidade para *M. capixaba* (93%) e *A. mellifera* (67%). A dose mais baixa desse herbicida (1/10 da dose de campo) causou uma mortalidade de 36% para os indivíduos expostos de *A. mellifera*, entretanto não causou mortalidade de nenhum indivíduo de *M. capixaba*, assim como a dose de campo de mancozeb para os indivíduos dessa mesma espécie. A dose mais baixa de mancozeb causou uma mortalidade de 1,7% em *M. capixaba*. Para *A. mellifera* a mortalidade causada por mancozeb foi de 27% e 35% para a dose campo e 1/10 da dose de campo respectivamente. No controle a mortalidade para *M. capixaba* foi de 2% enquanto que para *A. mellifera* foi de 18%.



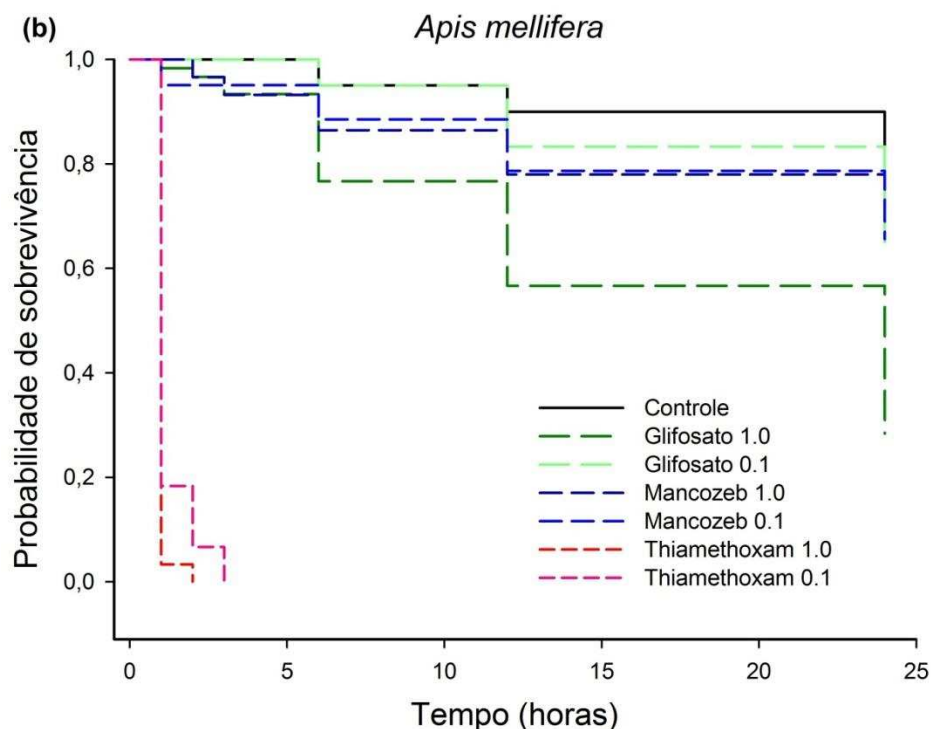


Fig. 3 Curvas de sobrevivência de operárias adultas da abelha *M. capixaba* (a) e *A. mellifera* (b) expostas por ingestão aos tratamentos: T1 – controle; T2 dose de campo de glifosato (17,5g/L); T3 – dose diluída 1/10 de glifosato (1,75g/L); T4 – dose de campo de mancozeb (2,5g/L); T5 – dose diluída 1/10 de mancozeb (0,25 g/L); T6 – dose de campo de thiamethoxam (0,2g/L) e T7 – dose diluída 1/10 de thiamethoxam (0,02g/L). O eixo x representa o tempo em horas e o eixo y a probabilidade de sobrevivência.

4.4. Capacidade de voo de abelhas expostas por contato

Para a análise do nível máximo de voo na torre o teste estatístico indicou diferença significativa entre os tratamentos analisados para as abelhas *M. capixaba* ($\chi^2 = 46,952$, g.l.= 5, $p < 0,001$) e *A. mellifera* ($\chi^2 = 28,718$, g.l.= 6, $p < 0,001$) expostas por contato. As abelhas de *M. capixaba* expostas a dose de campo de thiamethoxam não entraram como dados para esse bioensaio uma vez que todos os indivíduos morreram antes das 24 horas de exposição. As duas doses de mancozeb afetaram significativamente a capacidade de voo dos indivíduos de *M. capixaba* e *A. mellifera* expostos por contato com esse fungicida, assim como a dose mais baixa de thiamethoxam para os indivíduos de *M. capixaba*, pois grande parte dos indivíduos expostos a esses tratamentos permaneceram na base da torre (Fig.4).

O teste realizado para o segundo parâmetro desse bioensaio, para analisar possíveis diferenças no tempo (segundos) em que as abelhas alcançariam seu nível

máximo, indicou que não houve diferença significativa entre os tratamentos para *M. capixaba* ($\chi^2 = 9.942$, g.l.= 5 e $p = 0,07689$) e *A. mellifera* ($\chi^2 = 11,814$, g.l.= 6 e $p = 0,06625$) (Fig. 5). Para essa análise as abelhas que ficaram na base da torre (nível zero) também não entraram como dados para essa análise.

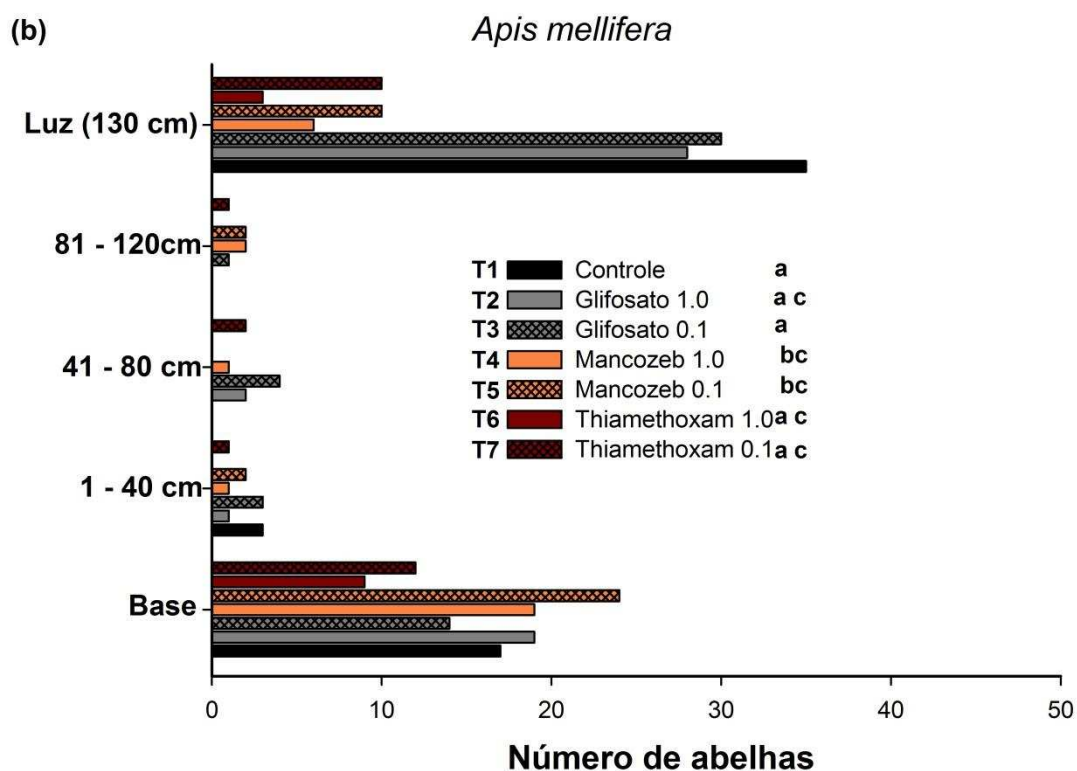
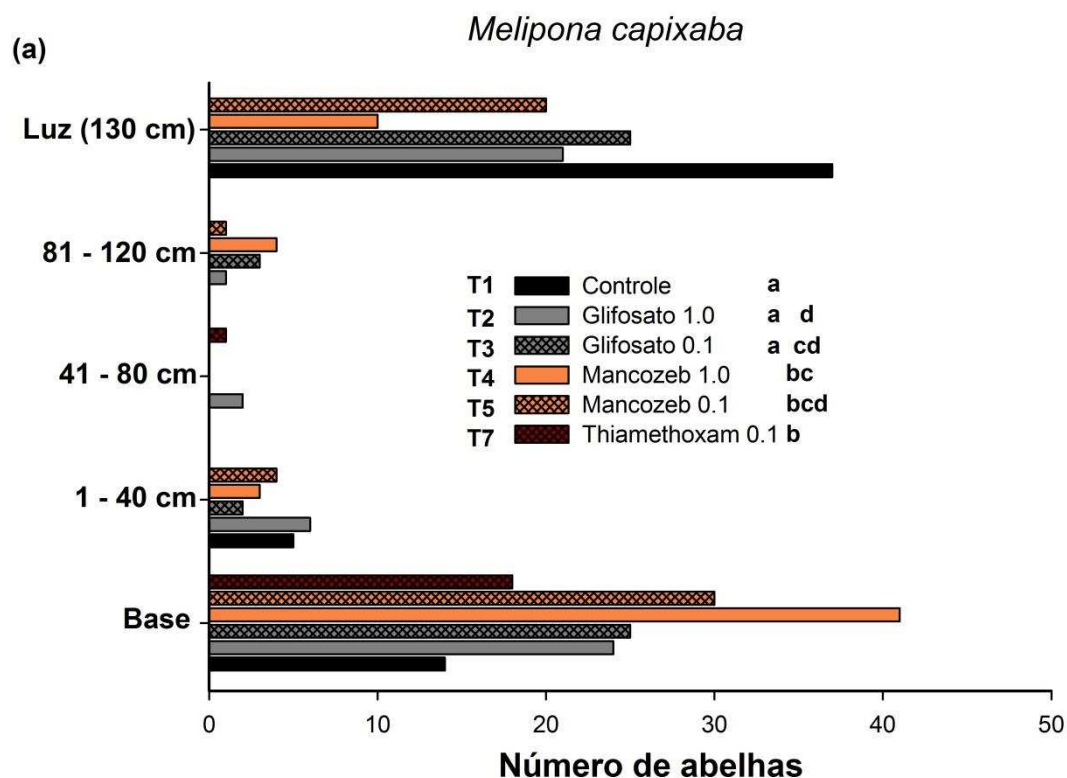


Fig. 4 Atividade de voo das operárias de *M. capixaba* (a) e *A. mellifera* (b) 24 horas após a exposição por contato aos tratamentos: T1 – controle; T2 dose de campo de glifosato (17,5g/L); T3 – dose diluída 1/10 de glifosato (1,75g/L); T4 – dose de campo de mancozeb (2,5g/L); T5 – dose diluída 1/10 de mancozeb (0,25 g/L); T6* – dose de campo de thiamethoxam (0,2g/L) e T7 – dose diluída 1/10 de thiamethoxam (0,02g/L). Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem significativamente conforme qui quadrado de Wald ($p < 0,05$). (*) Não houve sobreviventes da espécie *M. capixaba* para teste de voo, neste tratamento.

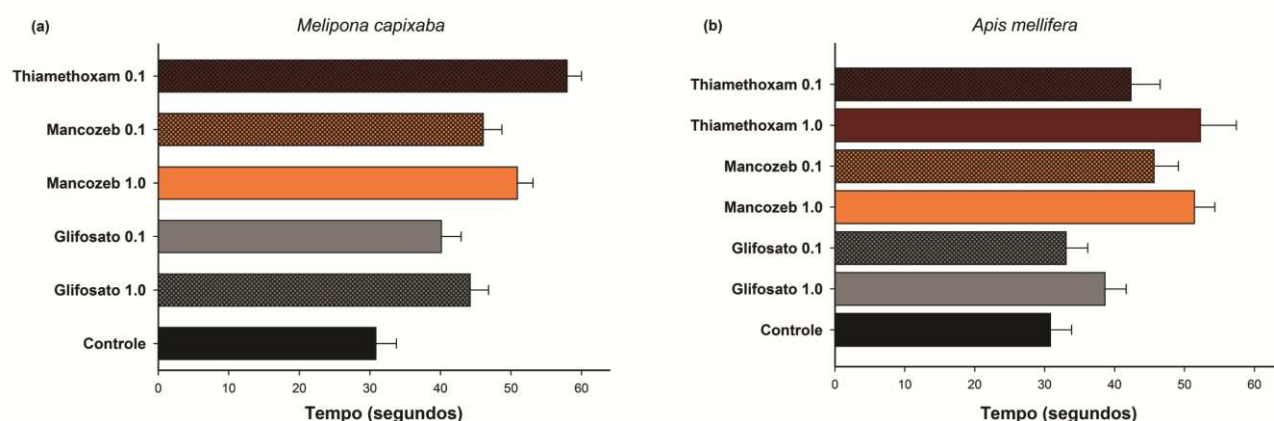


Fig. 5. Tempo gasto (em segundos) pelas sobreviventes de *M. capixaba* (a) e *A. mellifera* (b) para chegar ao seu nível máximo da torre após a exposição por contato aos tratamentos: T1 – controle; T2 dose de campo de glifosato (17,5g/L); T3 – dose diluída 1/10 de glifosato (1,75g/L); T4 – dose de campo de mancozeb (2,5g/L); T5 – dose diluída 1/10 de mancozeb (0,25 g/L); T6* – dose de campo de thiamethoxam (0,2g/L) e T7 – dose diluída 1/10 de thiamethoxam (0,02g/L). (*) Não houve sobreviventes da espécie *M. capixaba* para teste de voo, neste tratamento.

4.5. Capacidade de voo de abelhas expostas por ingestão:

Para as abelhas expostas por ingestão o teste estatístico indicou diferença significativa entre os tratamentos analisados para as abelhas *M. capixaba* ($\chi^2 = 18,012$ g.l. = 4 e $p < 0,001$) e *A. mellifera* ($\chi^2 = 43,952$ g.l. = 4 e $p < 0,001$), no que se refere ao nível máximo alcançado na torre. As operárias das duas espécies expostas à dose de campo e 1/10 dessa dose do inseticida thiamethoxam não entraram como dados para esse bioensaio, uma vez que todos os indivíduos morreram nas primeiras horas de exposição. Para os indivíduos de *A. mellifera* as doses de campo de glifosato e mancozeb causaram alteração na capacidade de voo dessa espécie, uma vez que grande parte das abelhas

permaneceram na base da torre durante o teste. (Fig. 6b). Entretanto, para *M. capixaba* apenas a dose de campo de glifosato causou esse efeito (Fig. 6a).

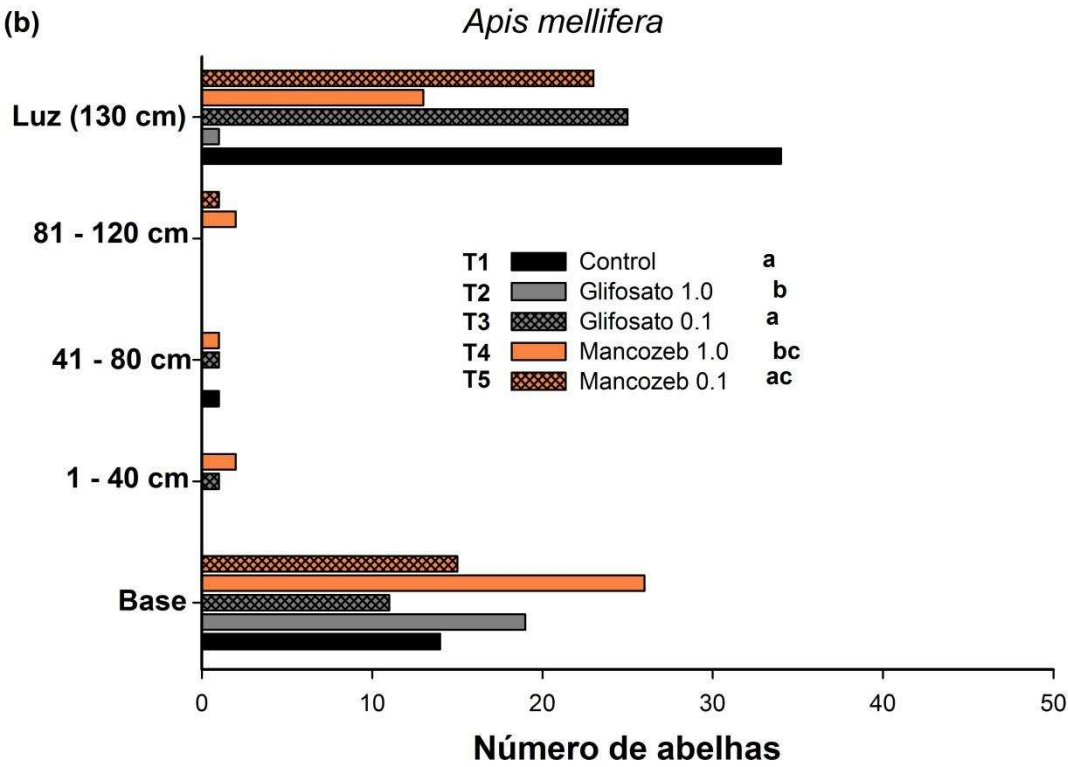
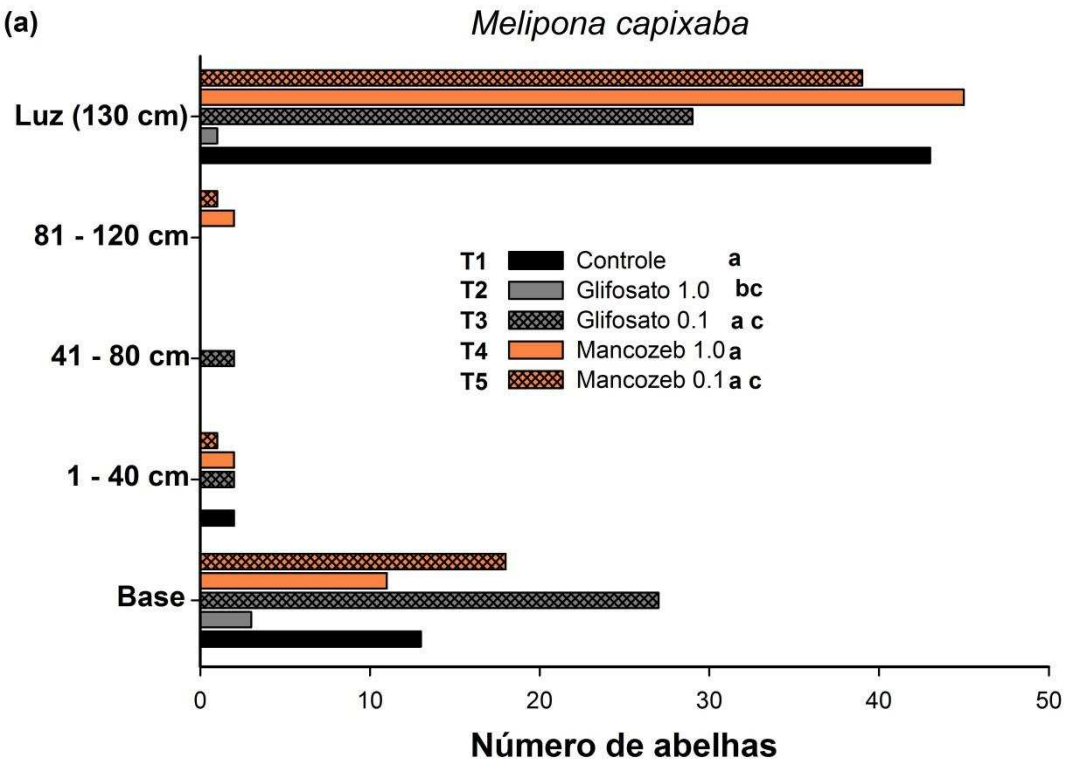


Fig. 6 Atividade de voo das operárias de *M. capixaba* (a) e *A. mellifera* (b) 24 horas após a exposição por ingestão aos tratamentos: : T1 – controle; T2 dose de campo de glifosato (17,5g/L); T3 – dose diluída 1/10 de glifosato (1,75g/L); T4 – dose de campo de mancozeb (2,5g/L); T5 – dose diluída 1/10 de mancozeb (0,25 g/L). Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem significativamente conforme qui quadrado de Wald ($p < 0,05$).

O teste realizado para o segundo parâmetro desse bioensaio de exposição por ingestão, para analisar possíveis diferenças no tempo (segundos) em que as abelhas alcançariam seu nível máximo, indicou que não houve diferença significativa entre os tratamentos para *M. capixaba* ($\chi^2 = 4.6195$, g.l.= 4 e $p = 0,3286$) e *A. mellifera* ($\chi^2 = 7,5293$ g.l.= 4 e $p = 0,1104$) (Fig. 7). As abelhas que ficaram na base da torre (nível zero) não entraram como dados para essa análise.

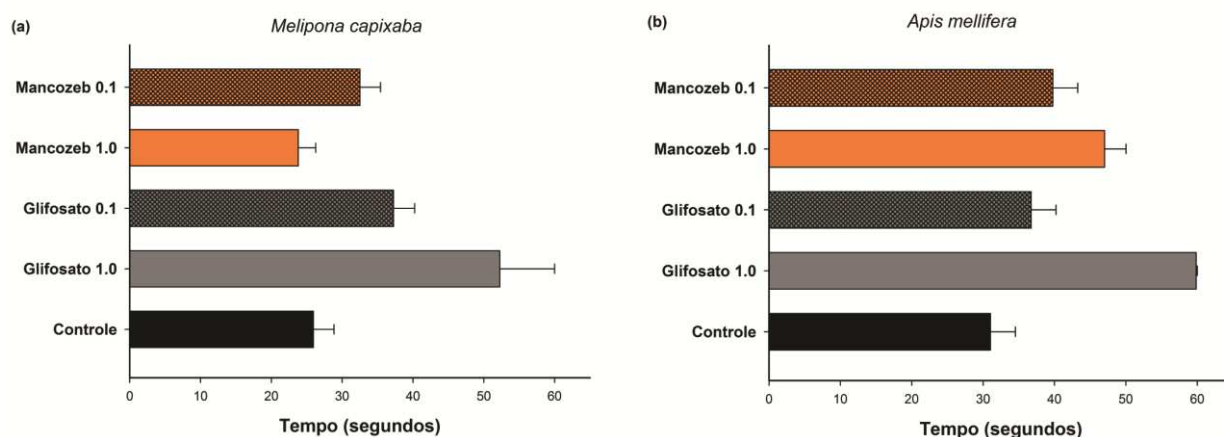


Fig. 7. Tempo gasto (em segundos) pelas sobreviventes de *M. capixaba* (a) e *A. mellifera* (b) para chegar ao seu nível máximo da torre após a exposição por ingestão aos tratamentos: T1 – controle; T2 dose de campo de glifosato (17,5g/L); T3 – dose diluída 1/10 de glifosato (1,75g/L); T4 – dose de campo de mancozeb (2,5g/L); T5 – dose diluída 1/10 de mancozeb (0,25 g/L).

5. DISCUSSÃO

5.1 Consequências da ausência de repelência dos agrotóxicos thiamethoxam, mancozeb e glifosato para as abelhas *M. capixaba* e *A. mellifera*

Conforme mostrado no presente trabalho os resultados do teste de repelência indicaram que nenhum dos agrotóxicos testados repeliu as operárias de *M. capixaba* e *A. mellifera* durante a alimentação. Balbuena e colaboradores (2015) também relatam a não rejeição de solução de sacarose contendo glifosato em diferentes concentrações. Nossos resultados sugerem que, ao forragearem, as operárias das duas espécies não serão repelidas em campo após ou durante a aplicação dos produtos testados, ficando expostas e susceptíveis aos potenciais efeitos danosos dos agrotóxicos.

Uma vez que não há repelência, fontes de recursos contaminados (resina, pólen e néctar) serão normalmente transportados para a colmeia, podendo ter efeitos prejudiciais não só para as operárias forrageiras, como para toda a colônia que potencialmente poderá se alimentar com recursos contaminados. Diversos estudos têm demonstrado a presença de resíduos de agrotóxicos em fontes de alimentos coletados pelas abelhas, como pólen e néctar (Chauzat *et al.*, 2006; Dively e Alaa, 2012, Mullin *et al.*, 2010). Mesmo quando esses resíduos se encontram em níveis mais baixos e com ausência de mortalidade significativa das abelhas forrageiras, os riscos dessa exposição ainda devem ser considerados uma vez que a exposição das abelhas a doses mais baixas pode ocasionar efeitos subletais que também comprometem o desenvolvimento e manutenção da colônia (Desneux *et al.*, 2007).

Além da não repelência um outro fator que pode aumentar os riscos de exposição de agrotóxicos para abelhas é a preferência por recursos alimentares contendo resíduos desses produtos. Kessler e colaboradores (2015) verificaram que as espécies *Apis mellifera* e *Bombus terrestris* quando submetidas a um teste de escolha, preferiam consumir o alimento (solução de sacarose) contendo imidacloprid e thiamethoxam nas faixas de concentrações encontradas em néctar e pólen contaminados (1Nm, 10nM, 100 nM e 1µM) quando comparado ao alimento puro. Essa preferência é provavelmente devido ao mecanismo de ação desses inseticidas nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no cérebro das abelhas, possivelmente afetando mecanismos neurais relacionados com aprendizagem sobre a localização de alimentos gratificantes, como sugerido pelo próprio autor. Esse comportamento sugere que em campo as abelhas possivelmente não controlam a exposição aos neonicotinoides e podem até preferir

alimentos contaminados, em detrimento a fontes de recursos não contaminadas. Essa constatação pode tornar estratégias de mitigação como fontes alternativas de recursos em margens de campo na agricultura insuficientes para diminuir a exposição de polinizadores em áreas cultivadas (Marshall e Moonen, 2002).

Portanto a possível preferência por alimentos contaminados relatada por Kessler e colaboradores (2015), a não repelência dos agrotóxicos testados nesse trabalho para as abelhas, associados com a ampla utilização desses produtos na área de ocorrência natural de *M. capixaba*, possivelmente representa uma das ameaças para a população dessa e outras espécies.

5.2 Impacto dos agrotóxicos thiamethoxam, mancozeb e glifosato na sobrevivência de *M. capixaba* e *A. mellifera*

Dentre os insetos as abelhas são consideradas mais vulneráveis a exposição aos agrotóxicos. Isso ocorre porque o genoma das espécies pertencentes a esse grupo apresentam menos genes que codificam enzimas desintoxicantes em comparação com outros insetos (Claudianos *et al.*, 2006). Isso pode explicar a alta mortalidade das abelhas expostas aos agrotóxicos relatados em diversos estudos (Carvalho *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013; Iwasa *et al.*, 2004; Mommaerts *et al.*, 2010).

A escala de toxicidade para *M. capixaba* e *A. mellifera* expostas por ingestão foi thiamethoxam T1 e T2 > glifosato T5 > glifosato T6, mancozabeb T3, T4; não havendo diferença significativa entre estes últimos tratamentos. A toxicidade desses agrotóxicos foram semelhantes para as duas espécies nessa via de exposição. Entretanto houve diferença na toxicidade por contato. A escala de toxicidade por contato para *M. capixaba* pode ser expressa por thiamethoxam T1 > thiamethoxam T2 e o restante dos tratamentos não diferiram do controle. Já para *A. mellifera* a escala foi de thiamethoxam T1 > thiamethoxam T2 > mancozeb T3 e mancozeb T4. Os demais tratamentos não diferiram significativamente do controle.

O modo de ação do agrotóxico e a semelhança fisiológica entre insetos pragas e organismos não-alvo são fatores responsáveis pela toxicidade desses produtos nesses últimos (Sanchèz-Bayo *et al.*, 2012). Os inseticidas pertencentes a classe dos neonicotinóides, como no caso do thiamethoxam, são seletivos aos insetos em relação a sua toxicidade (Tomizawa e Casida, 2003). Portanto sendo insetos, as abelhas são susceptíveis aos efeitos danosos causados por esses inseticidas, o que explica a alta

toxicidade de thiamethoxam, independente da via de exposição, em relação aos outros agrotóxicos testados no presente trabalho.

Alguns produtos agrícolas como herbicidas e fungicidas podem ser vistos como seguros ou menos tóxico para insetos não-alvos como as abelhas, uma vez que estes não apresentam a rota metabólica de ação desses agrotóxicos (Gisi e Sierotzki, 2008; Steinrticken e Amrhein, 1980). Entretanto foi observada uma alta mortalidade dos indivíduos de *M. capixaba* e *A. mellifera* expostos por ingestão com a dose utilizada em campo de glifosato, assim como para *A. mellifera* exposta por contato com as duas doses de mancozeb. Essa alta toxicidade pode ser explicada pelo fato de ter sido utilizado o produto comercial e não apenas o ingrediente ativo em questão. Para aumentar a eficácia dos pesticidas diversos compostos/adjuvantes são acrescentados a fórmula para formar o produto comercial (Mulin et al., 2015). Um estudo recente realizado por Zhu e seus colaboradores (2014) demonstraram que os ingredientes inertes, presentes nas formulações comerciais também são tóxicos para as abelhas. Além disso um teste realizado com o surfactante polioxietilenamida (POEA), comumente utilizados em herbicidas contendo o glifosato como ingrediente ativo, demonstrou que esse composto apresentou alta toxicidade para anfíbios, assim como todos as formulações comerciais contendo POEA (Howe et al., 2004). Portanto é possível que a toxicidade observada no presente estudo seja devido aos composto que formam o produto comercial e não ao ingrediente ativo em questão. Entretanto esses compostos acrescentados a fórmula comercial geralmente não são divulgados pelos fabricantes, dificultando conclusões sobre a toxicidade dos mesmos, o que possivelmente está relacionado com o baixo número de estudos incluindo esses adjuvantes nas avaliações de riscos para insetos não-alvos (Mulin et al., 2015). Entretanto o impacto desses não devem ser negligenciados já que as abelhas podem ser suscetíveis a esses outros compostos presentes na fórmula comercial (Zhu et al., 2014).

Como já relatado a sobrevivência das duas espécies testadas foi significativamente afetada pela exposição oral com a dose de campo testada do herbicida glifosato. Essa exposição causou uma mortalidade de 67% das abelhas de *A. mellifera* e 93% das operárias de *M. capixaba*. A alta mortalidade da abelha *M. capixaba* revela uma possível maior vulnerabilidade das abelhas sem ferrão expostas a esse agrotóxico e é um fator que deve ser considerado nos programas de conservação das espécies de abelhas ameaçadas de extinção. Duas outras espécies do gênero *Melipona* estão igualmente consideradas

como ameaçadas de extinção, a espécie *M. scutellaris* de ocorrência na Mata Atlântica do Nordeste Brasileiro, e *M. rufiventris*, de ocorrência no Cerrado do Centro-oeste brasileiro (Brasil, 2014). Nessas áreas, assim como em todo território brasileiro, a utilização de herbicida à base de glifosato se tornou prática rotineira, seja no controle de ervas daninhas nas extensas áreas agrícolas de monoculturas de grãos transgênicos resistentes ao glifosato, soja por exemplo, seja pela facilidade de capina química nas propriedades rurais de toda ordem (Ibama, 2009; Kleba, 1998). Apesar do fato de que o impacto de agrotóxicos como herbicidas e fungicidas para polinizadores, em especial as abelhas, têm recebido pouca atenção nas avaliações de periculosidade (Balbuena *et al.*, 2015), os resultados aqui apresentados confirmam que tais danos não podem ser desprezados quanto ao seu potencial impacto negativo e risco à sobrevivências dos polinizadores.

Para nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a constatar alta mortalidade de abelhas expostas à dose de campo do herbicida glifosato. No entanto na literatura danos indiretos causados por esse herbicida já foram relatados. Como demonstrado por Gregorc e Ellis (2011) que observaram um aumento significativo na apoptose de células do intestino médio de larvas de *A. mellifera* em relação ao controle. A porcentagem de morte celular foi de 69% para as abelhas alimentadas com dietas contendo resíduos de glifosato. Essa porcentagem foi estatisticamente semelhante a das abelhas expostas com imidacloprid que apresentaram um nível de 61% de apoptose nos tecidos das larvas expostas a esse tratamento. Como o imidacloprid é reconhecido como altamente nocivo para as abelhas, a semelhança na toxicidade descrita por esse estudo relata o impacto que herbicidas como o glifosato pode apresentar para as populações de abelhas (Fairbrother *et al.*, 2014). Esses dados associados aos resultados aqui obtidos reforçam a necessidade de cuidado que se deve ter durante a aplicação desse produto em áreas de cultivo próximo a ambientes naturais, a fim de diminuir a exposição das abelhas nativas a esse agrotóxico.

Outro impacto causado pela aplicação dos herbicidas também deve ser considerado. As culturas resistentes ao glifosato têm aumentado a utilização dos produtos contendo esse ingrediente ativo em sistemas agrícolas intensivos (Owen e Zelaya, 2005). Como consequência essa prática têm removido plantas nativas e ervas daninhas no entorno de áreas de cultivo, sendo essas plantas consideradas como pragas pelos produtores, utilizadas pelas abelhas como fonte de recursos alimentares (Nicholls e Altieri, 2012). Essa diminuição na diversidade florística poderá afetar a sobrevivência e,

em longo prazo, a perpetuação de diversas espécies de abelhas nativas principalmente aquelas especialistas (Brittain e Potts, 2011).

Ao contrário do glifosato as duas doses do fungicida mancozeb causaram mortalidade significativa somente na exposição por contato e apenas para espécie *A. mellifera*. A diferença da toxicidade desse agrotóxico para as duas espécies pode ser explicada pelas diferenças na história de vida de cada uma, tais como características morfológicas, fisiológicas e comportamentais distintas entre os indivíduos dessas espécies (Brittain e Potts, 2011). No entanto mesmo não causando mortalidade significativa de *M. capixaba* a segurança desse fungicida deve ser questionada, uma vez que a exposição aos agrotóxicos podem também levar a efeitos subletais, como prejuízo no processo de aprendizagem, alterações na mobilidade e orientação durante o forrageamento, diminuição na longevidade do indivíduo adulto dentre outros. Esses efeitos podem também comprometer em longo prazo o desenvolvimento e sobrevivência da colônia (Desneux *et al.*, 2007).

Outro aspecto importante que não pode ser desprezado é o fato de que, não causando mortalidade nas operárias forrageiras pelo contato com recursos florais contaminados, tais operárias continuam exercendo suas funções, podendo levar pólen contaminado com resíduos de fungicida. Isso pode desencadear um efeito de contaminação massiva do alimento, tendo em vista que as abelhas sem ferrão do gênero *Melipona* estocam o pólen em potes onde ocorrerá a fermentação. A presença do fungicida na colônia pode afetar a sobrevivência dos microorganismos benéficos que atuam na fermentação natural do pólen podendo comprometer o processo de fermentação e consequentemente a qualidade do alimento (Yoder *et al.*, 2013). Além disso, uma nutrição de qualidade é essencial para o crescimento, desenvolvimento saudável das colônias e resistências a outros estressores como infecções por parasitas. Portanto o comprometimento da qualidade desse alimento pode ter consequências para todos os estágios de desenvolvimento (Brodschneider e Crailsheim, 2010). Deste modo mesmo não causando mortalidade significativa para *M. capixaba* os riscos da exposição pelo mancozeb e possivelmente outros fungicidas, ainda devem ser considerados em estudos toxicológicos uma vez que danos indiretos também podem comprometer o desenvolvimento e sobrevivência das colônias em longo prazo.

Os resultados do presente trabalho mostram que as duas doses do inseticida thiamethoxam foram altamente tóxicas para as duas espécies independente da via de exposição, assim como observado em outros trabalhos realizados com *A. mellifera* (Carvalho *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013). Bioensaios realizados para determinar a toxicidade de diversos inseticidas pertencentes à classe dos neonicotinóides demonstraram que o inseticida thiamethoxam apresentou um alto nível de toxicidade para a espécie *A. mellifera*, semelhante ao encontrado para o imidacloprid que é considerado como o mais tóxico dentre os neonicotinóides (Iwasa *et al.*, 2004). Essa relação na toxicidade desses dois compostos pode ser explicada pela semelhança química de suas moléculas. Além disso, a clotianidina que é um metabólito do thiamethoxam têm sido considerado altamente tóxico o que explica a semelhança na toxicidade de imidacloprid e thiamethoxam para organismos não-alvos (Mommaerts *et al.*, 2010).

A alta mortalidade relatada nesse estudo foi verificada em um curto período após a exposição das abelhas ao thiamethoxam. Outros estudos realizados com *A. mellifera* e *B. terrestris* são consistentes com os resultados aqui apresentados para *M. capixaba* e *A. mellifera*. Costa e colaboradores (2013) observaram alta mortalidade, cerca de 80-100% em pouco tempo de exposição dos indivíduos adultos de *A. mellifera* expostos às dosagens recomendadas pelo fabricante em diferentes vias de exposição (alimentação, contato com folhas contaminadas e pulverização direta), assim como relatado por Mommaerts e colaboradores para *B. terrestris* (2010).

Além da mortalidade a exposição das abelhas a doses subletais de thiamethoxam podem causar danos fisiológicos, morfológicos e comportamentais. Catae e colaboradores (2014) demonstraram que uma dose subletal (0,0428 ng/mL por abelha) de thiamethoxam afetam funções como absorção e excreção, exercidas pelos túbulos de malpigh que são danificados após exposição ao produto. Doses subletais também causaram alterações morfológicas e histoquímicas no cérebro e intestino médio da abelha *A. mellifera*. (Oliveira *et al.*, 2012; Mommaerts *et al.*, 2010). A exposição a doses subletais pode também diminuir o sucesso reprodutivo das abelhas como demonstrado por Sandrock e colaboradores (2014) para a abelha solitária *Osmia bicornis*. Além de todos esses efeitos citados para os indivíduos adultos, os danos da exposição ao thiamethoxam podem afetar também indivíduos imaturos, como relatado para *A. mellifera* e para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* (Tavares *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2016).

De uma forma geral a mortalidade das abelhas expostas por contato foi menor em relação a exposição por ingestão, entretanto os impactos por essa via de exposição não deve ser negligenciado. A morte de colônias de *M. capixaba* em meliponário após aplicação de agrotóxicos em lavouras de tomate já foi verificada (informação pessoal Prof. Helder Resende). Estes casos ocorreram em colônias mantidas dentro de mata nativa e em meliponários afastados da lavoura de aplicação. A não repelência aos agrotóxicos e a baixa mortalidade de abelhas nos testes de exposição por contato em relação aos testes de ingestão podem explicar tal situação. Isso porque, por possivelmente não morrerem em campo após o contato com agrotóxico, as abelhas forrageadoras poderão transportar pólen contaminado para a colônia, que serão consumidos pelos indivíduos da colmeia, especialmente as fases imaturas. Assim, mesmo a exposição por contato não apresentando alta toxicidade, os possíveis impactos devem ser considerados, uma vez que a presença de alimento contaminado dentro da colônia irá expor toda a população da colmeia aos efeitos tóxicos verificados nos testes por ingestão.

Por fim os agrotóxicos testados alteraram significativamente a sobrevivência das abelhas expostas a esses produtos. Entretanto além da mortalidade direta do indivíduo, estudos que avaliem danos indiretos causados pela exposição, também são de fundamental importância para compreensão a longo prazo do impacto desses produtos.

5.3 Alterações na capacidade de voo das abelhas *M. capixaba* e *A. mellifera* expostas por contato e ingestão aos agrotóxicos thiamethoxam, mancozeb e glifosato

Apesar das concentrações testadas do fungicida mancozeb não terem causado mortalidade significativa para *M. capixaba* em nenhuma via de exposição, os resultados do teste de voo realizado indicou que o impacto de produtos como os fungicidas não devem ser negligenciados. As duas doses desse produto comprometeram a atividade de voo das duas espécies expostas por contato e também para os indivíduos da espécie *A. mellifera* expostos à dose de campo por ingestão. A alteração na capacidade de voo possivelmente levará a um forrageio ineficiente das abelhas campeiras com consequências para toda colônia (Desneux *et al.*, 2007).

A exposição por ingestão ao herbicida glifosato também causou alteração na capacidade de voo de *M. capixaba* e *A. mellifera*. Esses dados aqui apresentados corroboram com os resultados de uma recente pesquisa conduzida em campo por Balbuena e seus colaboradores (2015). Nesse estudo eles avaliaram o efeito da exposição por ingestão das forrageiras de *A. mellifera* a doses de glifosato recomendadas para

pulverização em ambientes agrícolas. Eles observaram que durante o forrageio as abelhas expostas anteriormente atrasaram no retorno para colônia, em comparação com as abelhas pertencentes ao controle. Além disso, em alguns casos, as trajetórias de voo também foram afetadas após exposição sucessiva ao herbicida.

As duas doses do inseticida thiamethoxam foram altamente tóxicas para as espécies testadas. A realização do teste de voo com as abelhas sobreviventes demonstrou que houve alteração na capacidade de voo dos indivíduos testados. Em um experimento de campo realizado por Henry e colaboradores (2012) foi observado que doses subletais de thiamethoxam, além de causarem mortalidade, afetam também o forrageio de indivíduos de *A. mellifera*, pois o número de forrageiras expostas que voltaram para a colônia foi significativamente menor quando comparado com as abelhas pertencentes ao controle. Doses subletais do inseticida imidacloprid, outro neonicotinóide, também alteraram a capacidade de voo da abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (Tomé *et al.*, 2015a). Esses resultados reafirmam o impacto dos inseticidas pertencentes à classe dos neonicotinóides e sua possível contribuição no declínio das populações de abelhas nativas. Portanto o uso desses produtos principalmente em áreas próximas as vegetações naturais devem ser questionados.

O voo é essencial durante a atividade de forrageio das abelhas. Como relatado, todos os agrotóxicos testados causaram alterações na capacidade de voo de *M. capixaba* e *A. mellifera*, podendo possivelmente afetar o forrageio dessas espécies. Como a colônia necessita desse serviço pelas abelhas forrageiras a alteração desse comportamento causada pela exposição aos agrotóxicos pode diminuir o desempenho das abelhas em campo, interferindo em toda dinâmica da colônia (Colin *et al.*, 2004). Durante o forrageio as abelhas necessitam da integridade de suas capacidades cognitivas relacionadas com a memória, que lhes permite orientação através de informações ambientais adquiridas anteriormente para localização e reconhecimento de recursos como alimento e posteriormente retorno para colônia (Balbuena *et al.*, 2015). Em campo é possível que essas abelhas coletem recursos contendo resíduos de produtos químicos o que pode comprometer essa capacidade cognitiva relacionada com a orientação, memória e aprendizado (Balbuena *et al.*, 2015; Herbert *et al.*, 2014; Mullin *et al.*, 2010). Essas alterações podem aumentar a mortalidade em campo, consequentemente interferindo no armazenamento de alimentos dentro da colônia, além de causar danos no comportamento e execução das funções desempenhadas por cada indivíduo dentro da colônia (Sandrock

et al., 2014). Em longo prazo, esses efeitos levarão a prejuízos que impedirão a manutenção da colônia e consequentemente conservação da espécie (Colin *et al.*, 2004). Além disso, prejuízos econômicos podem advir da diminuição dos serviços de polinização devido ao forrageio ineficiente ou ao baixo número de abelhas presentes em campo (Brittain e Potts, 2011).

6. CONCLUSÃO

Este trabalho reforça a importância de considerar os impactos de diferentes classes de agrotóxicos como riscos potenciais para as espécies de abelhas ameaçadas de extinção. Os resultados sugerem que os três agrotóxicos testados causam impactos negativos para *M. capixaba*, sendo possivelmente um dos fatores que contribuem para a diminuição da população dessa espécie, uma vez que os três produtos são amplamente utilizados em sua região de ocorrência natural e em culturas cujas famílias são visitadas por essa espécie. A não repelência desses agrotóxicos sugere uma alta exposição das operárias de *M. capixaba* e *A. mellifera* a esses agrotóxicos durante o forrageio. Inseticidas pertencentes à classe dos neonicotinóides, como o thiamethoxam, pode causar alta mortalidade independente da via de exposição. A toxicidade de herbicidas e fungicidas também foi demonstrada. A dose de campo de glifosato foi altamente tóxica na exposição por ingestão causando alta mortalidade para os indivíduos das duas espécies além de comprometer o comportamento de voo de *A. mellifera*. O fungicida mancozeb também foi altamente tóxico para *A. mellifera* por contato, além de alterar o comportamento de voo das duas espécies nas duas vias de exposição. Portanto os resultados apresentados reforçam que o impacto do glifosato e do mancozeb em organismos não-alvo não pode ser negligenciado.

Levando em consideração o atual estado de ameaça de extinção da abelha *M. capixaba*, o impacto causado pelos produtos testados e a importância ecológica exercida pelas abelhas sem ferrão, torna-se indispensável estratégias de mitigação quanto ao uso desses agrotóxicos em prol da conservação desta espécie. Estes resultados contribuem para o aprimoramento de políticas públicas e ações de manejo e conservação da abelha ameaçada de extinção *M. capixaba* em seu ambiente natural.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento – Coordenação geral de agrotóxicos e afins/DFIA/DAS. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 28/11/2015.

AIZEN, M.A., GARIBALDI, L.A., CUNNINGHAM, S.A. & KLEIN, A.M. 2009. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Ann. Bot.* 103, 1-10.

ANVISA. 2016. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – PARA. Brasil, 246p.

ARENA, M., SGOLASTRA, F. 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*. 23, 324–334.

ARTZ, D.R.; PITTS-SINGER, T.L. 2015. Effects of Fungicide and Adjuvant Sprays on Nesting Behavior in Two Managed Solitary Bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. *PLoS ONE*, 10(8): e0135688.

BALBUENA, M.S.; TISON, L.; HAHN, M.L.; GREGGERS, U.; MENZEL, R.; FARINA, W.M. 2015. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *The Journal of Experimental Biology*. 218, 2799-2805.

BARBOSA, W.F.; DE MEYER, L.; GUEDES, R.N.C.; SMAGGHE, G. Lethal and sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*, 2014.

BAYLIS, A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Manag Sci.* 56, 299-308.

BIDDINGER, D.J.; ROBERTSON J.L.; MULLIN, C.; FRAZIER J.; ASHCRAFT, S.A.; RAJOTTE, E.G.; JOSHI, K.N.; VAUGHN, M. 2013. Comparative toxicities and

synergism of apple orchard pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). PLoS One 8: e72587.

BIESMEIJER, J. C.; ROBERTS, S. P. M.; REEMER, M.; OHLEMULLER, R.; EDWARDS, M.; PEETERS, T.; SCHAFFERS, A. P.; POTTS, S. G.; KLEUKERS, R.; THOMAS, C. D.; SETTELE, J.; KUNI, W. E. 2006. Parallel declines in pollinators and insect pollinated plants in Britain and the Netherlands. Science, 313, 351-354.

BLACQUIERE, T.; SMAGGHE, G.; CORNELIS A. M.; GESTEL, V.; MOMMAERTS, V. 2012. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. Ecotoxicology. 21, 973–992.

BRASIL. Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Instrução Normativa nº 3. 27 Maio, 2003.

BRASIL. Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Instrução Normativa nº 444. 18 Dezembro, 2014.

BRITAIN, C.; POTTS, S.G. 2011. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. Basic and Applied Ecology, 12, 321–331.

BRITAIN, C.A.; VIGHI, M.; BOMMARCO, R.; SETTELE, J.; POTTS, S.G. 2010. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. Basic and Applied Ecology. 11, 106–115.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. 2010. Nutrition and health in honey bees. Apidologie. 41, 278–294.

BRYDEN, J.; RICHARD J.; GILL, R.J.; MITTON, R.A.A.; RAINE, N.E.; JANSEN, V.A.A. 2013. Chronic sublethal stress causes bee colony failure. Ecology Letters. 16, 1463–1469.

CALVIELLOA, G.; PICCIONI, E.A.; BONINSEGNA, A.; TEDESCOA, B.; MAGGIANOB, N.; Simona SERINI, A.; WOLF, F.I.A.; PALOZZA, P. 2006. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 211, 87 – 96.

CARVALHO, F.P. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *environmental science & policy*. 9, 685–692.

CARVALHO, S.M.; CARVALHO, G.A.; CARVALHO, C.F.; BUENO FILHO, J.S.S.; BAPTISTA, A.P.M. 2009. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para abelha africanizada *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Arqu Inst Biol*. 76, 597–606.

CATAE, A.F.; ROAT, T.C.; OLIVEIRA, R.A.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O. 2014. Cytotoxic Effects of Thiamethoxam in the Midgut and Malpighian Tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microscopy research and technique*, 77, 274–281.

CEPEMAR. 2004. Plano de manejo do Parque Estadual da Pedra Azul. Serviços de Consultoria em Meio Ambiente. Relatório 199/04. Disponível online em: <http://www.idaf.es.gov.br/Download/Parques/Plano de Manejo PA RT199-04.pdf>.

CHARLTON, A.J.A.; JONES, A. 2007. Determination of imidazole and triazole fungicide residues in honeybees using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 1141, 117–122.

CHAUZAT, M.P.; FAUCON, J.P.; MARTEL, A.C.; LACHAIZE, J.; COUGOULE, N.; AUBERT, M.A. 2006. Survey of Pesticide Residues in Pollen Loads Collected by Honey Bees in France. *J. Econ. Entomol*. 99, 253-262.

CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R.M.; BISWAS, S.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT JG. 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol Biol*. 15, 615–636.

COLIN, M.E.; BONMATIN, J.M.; MOINEAU, I.; GAIMON, C.; BRUN, S. VERMANDERE, J.P. 2004. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47, 387-395.

CONSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBERK, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, SHAHID.; O'NEILL, ROBERT.; PARUELO, J.; RASKIN, R.G.; SUTTON, P.; VAN DEN BELT, M. 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. NATURE. 387, 253-260.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; ROUBIK, D.W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.B.; VENTURIERE, G.C.; EARDLEY, G.C.; NOGUEIRA-NETO, P.N. 2006. Global Meliponiculture: challenges and opportunities. Apidologie. 37, 1–18.

COSTA, E.M.; ARAUJO, E.L.; MAIA, A.V.P.; SILVA, F.E.L.; BEZERRA, C.E.S.; SILVA, J.G.S. 2013. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. 45, 34-44.

DEL SARTO, M.C.L.; OLIVEIRA, E.E.; GUEDES, R.N.C.; CAMPOS, L.A.O. 2014. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. Apidologie. 45, 626–636.

DEL SARTO, M.C.L.; PERUQUETTI, R. C. & CAMPOS L.A.O. 2005. Evaluation of the Neotropical Stingless Bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as Pollinator of Greenhouse Tomatoes. J. Econ. Entomol. 98, 260-266.

DEVILLERS, J.; DECOURTYE, A.; BUDZINSKI, H.; PHAM-DELE`GUE, M.H.; CLUZEAU, S.; MAURIN, G. 2003. Comparative toxicity and hazards of pesticides to *Apis* and non-*Apis* bees. A chemometrical study, SAR and QSAR in Environmental Research. 14, 389-403.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.M. 2007. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 52, 81–106.

DIVELY, G.P.; ALAA, K. 2012. Insecticide Residues in Pollen and Nectar of a Cucurbit Crop and Their Potential Exposure to Pollinators. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4449–4456.

FAIRBROTHER, A.; ANDERSON, T.; FELL, R. 2014. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 33, 719-731.

FERNANDES, R.O. Avaliação Ecotoxicológica de Agrotóxicos, seus Componentes e Afins: Teste para o Parâmetro Abelhas. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. – Viçosa, MG, 2012.

GALLAI, N.B.; JEAN-MICHEL, J.S.; SETTELED, J.; VAISSIÈRE, B.E. 2009. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68, 810–821.

GIANESSI, L.P. 2005. Economic and herbicide use impacts of glyphosate-resistant crops. *Pest Manag Sci.* 61, 241–245.

GIANNINI, T.C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G.D.; CARTOLANO Jr, E.A.; VEIGA, E.A.K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; SARAIVA, A.M. 2014. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie.* 46, 209–223.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B .M.; SARAIVA, A. M.; 1 & IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 2015. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. *J. Econ. Entomol.* 108, 849-857.

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

GISI, U.; SIEROTZKI, H. 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *Eur J Plant Pathol*, 122, 157–167.

GREGORC, A.; ELLIS, J.D. 2011. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99, 200–207.

HEARD, T.A. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 183–206.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. 2012. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science*, 336, 348-350.

HERBERT, L. T.; VÁZQUEZ, D. E.; ANDRÉAS, A.; FARINA, W. M. 2014. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *J. Exp. Biol.* 217, 3457-3464.

HOWE, C.M.; BERRILL, M.; PAULI, B.D.; HELBING, C.C.; WERRY, K.; VELDHOF, N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four north american frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23, 1928–1938.

IBAMA-Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental. Brasília, Brasil, 2009, 85p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. 2010. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotrop.* 10, 60-62.

IWASA, T.; MOTOYAMA, N.; AMBROSE, J.T.; ROE, R.M. 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*. 23, 371–378.

JACOB, C.R.O.; SOARES, H.M.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O. 2014. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest Manag Sci.* 71, 114–122.

JOHNSON, R.M.; DAHLGRENN, L.; SIEGFRIED, B.D.; ELLIS, M.D. 2013. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS ONE* 8(1): e54092.

JUNIOR, O.P.A.; SANTOS, T.C.R. 2002 Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Quim. Nova.* 25, 589-593.

KAPLAN, E. L.; e MEIER, P. 1958. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53, 457–481.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. 1997. Pollinators, Flowering Plants, and Conservation Biology. *BioScience.* 47, 297-306.

KESSLER, S.C.; TIEDEKEN, E.J.; SIMCOCK, K.L.; DERVEAU, S.; MITCHELL, J.; SOFTLEY, S.; STOUT, J.C.; WRIGHT, G.A. 2015. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature.* 521, 74-76.

KEVAN, P. G.; VIANA, B. F. 2003 The Global decline of Pollination Services. *Tropical Conservancy.* 4, 3-8.

KLEBA, J.B. 1998. Riscos e benefícios de plantas transgênicas resistentes a herbicidas: O caso da soja RR da Monsanto. *Cadernos de ciências & tecnologia.* 15, 9-42.

KLEIN, A. M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFANDEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc. B.* 274, 303-313.

KULDNA, P.; PETERSON, K.; POLTIMÄE, H.; LUIG, J. 2009. An application of DPSIR framework to identify issues of pollinator loss. *Ecological Economics.* 69, 32–42.

LAYCOCK, L.; COTTERELL, K.C.; O'SHEA-WHELLER, T.A.; CRESSWELL, J.E. 2014. Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 100, 153–158.

LIMA, M.A.P.; MARTINS, G.F.; OLIVEIRA, E.E.; GUEDES, R.N.C. 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J Comp Physiol*. 202, 733-747.

LUZ, C.F.P.; FERNANDES-SALOMÃO T.M.; LAGE L.G.A.; RESENDE, H.C.; TAVARES, M.G.; CAMPOS, L.A.O. 2011. Pollen sources for *Melipona capixaba* Moure & Camargo: an endangered Brazilian stingless bee. *Psyche*, v. 2011, Article ID 107303, 7p.

MAIENFISCH, P.; HUERLIMANN, H.; RINDLISBACHER, A.; GSELL, L.; DETTWILER, H.; HAETTENSCHWILER, J.; SIEGER, E.; WALTI, M. 2001. The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest Management Science*, Sussex. 57, 165-176.

MARSHALL, E.J.P.; MOONEN, A.C. 2002. Field margins in northern Europe: their functions and interactions with agriculture. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 89, 5–21.

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM S.D.; KLEINER, D.; RAUH J.J.; GRAUSO, M.; SATTELLE, D.B. 2001. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacological Sciences*, 22, 573–580.

MICHENER, C.D. 2007 *The bees of the world*. London: The Johns Hopkins University Press. Second edition, 953p.

MOURE J.S.; CAMARGO J.M.F. 1994. *Melipona (Michmelia) capixaba*, uma nova espécie de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do sudeste do Brasil. Revista Brasileira de Zoologia. 11, 289-296.

MOMMAERTS, V.; REYNDERS, S.; BOULET, J.; BESARD, L.; STERK, G.; SMAGGHE, G. 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. Ecotoxicology, 19, 207-2015.

MULLIN, C.A.; CHEN, J.; FINE, J.D.; FRAZIER, M.T.; FRAZIER J.L . 2015. The formulation makes the honey bee poison. Pestic Biochem Physiol. 120, 27–35.

MULLIN, C.A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; ENGELSDORP, D.V.; PETTIS, J.S. 2010. High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. PLoS ONE. 5: e9754 19p.

MYERS, N.; MITTERMEIER, A.R.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B.; KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature. 403, 853-858.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER U.; SALGADO V.; KAUSSMANN M. 2003. Thiamethoxam is neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. Pest Biochem Physiol, 76, 55–69.

NICHOLLS, C. L.; ALTIERI, M. A. 2012. Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems. A review. Agronomy for Sustainable Development. 33, 257–274.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA. 2010. A polinização por vibração. Oecologia Australis, v. 1, 140-151.

OLIVEIRA, R.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O. 2012. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Environmental Toxicology. 29, 1122-1133.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*. 120, 321–326.

OWEN, M.D.K.; ZELAYA, I.A. 2005. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag Sci*. 61, 301–311.

PEREIRA, M.A. Tiametoxam em plantas de cana-de-açúcar, feijoeiro, soja, laranjeira e café: parâmetros de desenvolvimento e aspectos bioquímicos. Tese apresentada para obtenção do título de doutor. Piracicaba, ESALQ, USP, 2010.

PEREIRA, R.C. Seletividade de extratos botânicos às abelhas *Partamona helleri* e *Apis mellifera*. Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre – Viçosa, UFV, 2016.

PILLING, E.D.; JEPSON, P.C. 1993. Synergism between EBI fungicides and a pyrethroid insecticide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pesticide Science*. 39, 293–297.

PROENÇA C.E.B.; GIBBS P.E. 1994. Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from Central Brazil. *New Phytologist*. 126, 343–354.

R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAETANO, C.G.; KOBAYASHI, M.R.; KUWAHARA, W.R.; VINCHI, R.R. 2003. Application methods and dosages of thiamethoxam in thrips control on tomato plants. *Horticultura Brasileira*. v.21, 429–432.

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 1989. Utilization of floral resources by species of *Melipona* (Apidae, Meliponinae): floral preferences. *Apidologie*. 20, 185–195.

RAMALHO, M. 2004 Stingless bees and mass flowering trees in the canopy of Atlantic Forest: a tight relationship. *Acta bot. bras.* 18, 37-47.

RESENDE, H.C.; BARROS, F.; CAMPOS, L.A.O.; SALOMÃO, T.M.F. 2008. Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure e Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. *Neotropical Entomology*. 37, 609-611.

RESENDE, H.C.; SALOMÃO, T.M.F.; TAVARES, M.G., CAMPOS, L.A.O. 2014. Geographic distribution, key challenges, and prospects for the conservation of threatened Stinglees Bee *Melipona capixaba* Moure and Camargo (Hymenoptera: Apidae:Meliponini). *Sociobiology*. 61, 529-535.

RIGITANO, R.L.O.; LIMA, J.M.; GUERREIRO, M.C. 2008. Lixiviação do inseticida thiamethoxam em macrolisímetros de duas classes de solo. *Ciênc. Agrote.* 32, 1818-1823.

ROSA, A.S.; TEIXEIRA, J.S.G.; VOLLET-NETO, A.; QUEIROZ, E.P.; BLOCHTEIN, B.; PIRES, C.S.S.; IMPERATRIZ-FONSECA. 2016. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. *Apidologie*. 47, 729-738.

RUEPPEL, M. L.; BRIGHTWELL, B. B.; SCHAEFER, J. 1977. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 25, 517-528.

SANDROCK, C.; TANADINI, L.G.; PETTIS, J.S.; BIESMEIJER, J.C.; POTTS, S.G.; NEUMANN, P. 2014. Sublethal neonicotinoid insecticide exposure reduces solitary bee reproductive success. *Agricultural and Forest Entomology*, 16, 119–128.

SÁNCHEZ-BAYO, F. 2012. Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. *J Environment Analytic Toxicol*. S4:002.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA K. 2014. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. PLoS ONE 9(4): e94482, 16p.

SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT 9.2 User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.

SCHMIDT, L.S.; SCHMIDT, J.O.; RAO, H.; WANG, W.; XU, A. 1995. Feeding Preference and Survival of Young Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Fed Rape, Sesame, and Sunflower Pollen. *J Econ Entomol*, 88, 1591-1595.

SCHREINEMACHERS, P.; PRASNEE, T. 2012. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy*. 37, 616–626.

Secretaria de Estado da Agricultura, Abastecimento, Aquicultura e Pesca. 2008. Plano Estratégico de Desenvolvimento da Agricultura Capixaba: novo PEDEAG 2007-2025. Governo do Espírito Santo. Disponível online em: <http://www.seag.es.gov.br/pedeag/livro.htm>

SERRA B.D.V.; DA LUZ C.F.P.; CAMPOS L.A.O. 2012. The use of polliniferous resources by *Melipona capixaba*, an endangered stingless bee species. *Journal of Insect Science*. 12, 1-14.

SILVA, I.P.S.; OLIVEIRA, F.A.S.; PEDROZA, H.P.; GADELHA, I.C.N.; MELO, M.M.; SOTO-BLANCO, B. 2015 Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. *Apidologie*. 46, 703-715.

SLAA, E. J.; CHAVES, L.A.S.; MALAGODI-BRAGA, K.S.; HOFSTEDE, F.E. 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*. 37, 293-315.

SOARES, H.M.; JACOB, C.R.O.; CARVALHO, S.M.; NOCELLI, R.C.F.; MALASPINA, O. 2015. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). *Bull Environ Contam Toxicol*, 94, 675–680.

- SOUZA, J.C.; REIS, P.R.; RIGITANO, R.L.O.; CIOCIOLA-JÚNIOR, A.I. 2006. Eficiência de tiametoxam no controle do bicho-mineiro do cafeeiro: influência da modalidade de aplicação. *Coffee Science*. 1, 143- 149.
- STEINRTICKEN, H.C.; AMRHEIN, E.N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and biophysical research communications*. 94, 1207-1212.
- STONER, K.A.; EITZER, B.D. 2012. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS ONE* 7(6): e39114, 5p.
- TAPPARO, A.; GIORIO, C.; MARZARO, M.; MARTON, D.; Lidia SOLD, L.; GIROLAMI, V. 2011. Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds. *J. Environ. Monit.* 13, 1564–1568.
- TAVARES, D.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.Z.; MALASPINA, O. 2015. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*. 135, 370–378.
- THOMPSON, H.M. 2003. Behavioural effects of pesticides in bees—their potential for use in risk assessment. *Ecotoxicology*. 12, 317-330.
- THOMPSON, H. M.; LEVINE, S. L.; DOERING, J.; NORMAN, S.; MANSON, P.; SUTTON, P.; VON MÉREY, G. 2014. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 10, 463-470.
- TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R., SCHINDLER, D., SCHLESINGER, W.H., SIMBERLOFF, D., SWACKHAMER, S. 2001. Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*. 292, 281– 284.

TOLEDO, R. J.; GUILLÉN, S. D. 2014. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. *Acta Zoológica Mexicana*. 30, 408-413, 2014.

TOMÉ, H.V.V.; BARBOSA, W.F.; MARTINS, G.F.; GUEDES, R.N.C. 2015a. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere*. 124, 103–109.

TOMÉ, H.V.V.; BARBOSA W.F.; CORRÊA, A.S., GONTIJO, L.M., MARTINS, G.F & GUEDES, R.N.C. 2015b. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Ann Appl Biol*. 167, 186–196.

TOMÉ, H.V.V.; MARTINS, G.F., LIMA, M.A.P.; CAMPOS, L.A.O.; GUEDES, R.N. C. 2012. Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE*. 7(6): e38406.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J.E. 2003. selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol*. 48, 339–364

TONI, L.R.M.; SANTANA, H.; ZAIA, D.A.M. 2006. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Quim. Nova*. 29, 829-833.

TUKEY, J.W. 1953. The problem of multiple comparisons. Mimeographs Princeton University, Princeton, N.J.

VAN DER SLUIJS, J.P.; SIMON-DELISO, N.; GOULSON, D.; MAXIM, L., BONMATIN, J.M.; BELZUNCES, L.P. 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*. 5, 293-305.

WALD, A. 1943. Tests of statistical hypothesis concerning several parameters when the number of observations is large. *Transactions of the American Mathematical Society* 54,

426–482.

YODER, J.A.; JAJACK, A.J.; ROSSELOT, A.E.; SMITH, T.J.; YERKE, M.C.; SAMMATARO, D. 2013. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. J Toxicol Environ Health. 76, 587–600.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci, v. 1, p. 125-144, 2011.

ZHU, W.; SCHMEHL, D.R.; MULLIN, C.A.; FRAZIER, J.L. 2014. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. PLoS ONE 9(1): e77547.