

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

**Toxicidade e efeito subletal de inseticidas e formulações de iscas tóxicas sobre abelhas nativas *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**

**Aline Costa Padilha**

Pelotas, 2019

**ALINE COSTA PADILHA**

**TOXICIDADE E EFEITO SUBLETAL DE INSETICIDAS E FORMULAÇÕES DE  
ISCAS TÓXICAS SOBRE ABELHAS NATIVAS *Plebeia emerina* E *Tetragonisca  
fiebrigi* (HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINI)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Entomologia Agrícola).

Orientador: Dr. Marcos Botton

Coorientadores: Dr. Anderson Dionei Grützmacher

Dr. Moisés João Zotti

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

P123t Padilha, Aline Costa

Toxicidade e efeito subletal de inseticidas e formulações de iscas tóxicas sobre *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) / Aline Costa Padilha ; Marcos Botton, orientador ; Anderson Dionei Grützmacher, Moisés João Zotti, coorientadores. — Pelotas, 2019.

152 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Abelhas sem ferrão. 2. Toxicidade. 3. Atrai e mata. 4. Efeitos subletais. 5. Atratividade e repelência. I. Botton, Marcos, orient. II. Grützmacher, Anderson Dionei, coorient. III. Zotti, Moisés João, coorient. IV. Título.

CDD : 638.12

**Banca examinadora:**

---

Pesquisador Dr. Marcos Botton (Orientador)  
(Embrapa Uva e Vinho)

---

Pesquisadora Dra. Patrícia Nunes-Silva  
(Universidade do Vale do Rio dos Sinos)

---

Professora Dra. Aline Nondillo  
(Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul)

---

Pesquisador Dr. Dori Edson Nava  
(Embrapa Clima Temperado)

---

Professor Dr. Daniel Bernardi  
(Universidade Federal de Pelotas)

Aos meus pais,  
José Valdemar Godinho Padilha e Marilda Aparecida Costa Padilha  
**Dedico**

## **Agradecimentos**

À Deus por todas as bênçãos que recebi e por ser uma fonte de paz e luz em minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Fitossanidade (PPGFs), da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel” (FAEM), Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À Embrapa Uva e Vinho, pelo suporte e colaboração.

Ao Dr. Marcos Botton, orientador, pela sua confiança e dedicação na orientação desse trabalho e pelas oportunidades de aperfeiçoamento profissional e pessoal no decorrer do curso de Doutorado.

Ao Dr. Anderson Dionei Grützmacher, coorientador, pelo suporte e colaboração durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Moises João Zotti e Dr. Cristiano João Arioli pela participação no comitê de orientação.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Fitossanidade da FAEM/UFPEl pelos ensinamentos valiosos. E ao Professor Dr. Luis Avila, pelo apoio e incentivo como coordenador do curso durante o início do curso de Doutorado.

Ao Juliano Pazini, meu namorado, pelas suas contribuições durante o curso e auxílio na discussão e instalação dos experimentos, mas principalmente, por ser companheiro e me encorajar a ser cada vez melhor, obrigada pelo carinho e amor diários.

Às minhas colegas e amigas Bruna Piovesan e Maíra Morais pelo incentivo, auxílio na instalação dos experimentos, troca de conhecimento e toda ajuda, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP/UFPel), especialmente, Deise Cagliari, Maíra Morais, Bruna Piovesan, Juliano Pazini, Matheus Rakes e Paulo Azevedo pela amizade e bom convívio.

À Dra. Mariane Rosenthal (LabMIP/UFPel) pela amizade e auxílio na rotina de laboratório.

À assistente de pesquisa do Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho, Sra. Vânia Maria Ambrosi Sganzerla, pela amizade e auxílio durante esses anos e por compartilhar o amor pelas abelhas sem ferrão.

Às minhas queridas amigas do Casarão OnzeVinte, Virginia Scaglia Dias, Fernanda Roth, Juliana Tavares e Amanda Maciel, pelos momentos de descontração e amizade.

Às minhas amigas Deise Cagliari e Ellen Fonseca, pelos conselhos, conversas e momentos de diversão.

Aos colegas do laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho, em especial, Aline Nondillo, Simone Andzeiewski, Vitor Cezar Pacheco, Cleber Baronio, Joatan Rosa, Inana Schutze, Morgana Baldin, Ruben Machota Jr. e Lígia de Bortoli.

Aos meus pais José e Marilda, por me ensinarem que o conhecimento é a grande riqueza da vida, pelo amor incondicional e todo o apoio e incentivo durante minha vida.

Ao meu irmão Luciano, pelo amor, amizade, carinho e compreensão em todos os momentos de minha vida.

Ao meu pai José, que confeccionou os alimentadores artificiais e à Dra. Tatiane Kaehler que gentilmente nos forneceu treinamento para os experimentos de campo.

Aos meus familiares, em especial meus queridos avós, minha madrinha Maria e meu padrinho Roke, pelo incentivo, carinho e apoio durante toda minha vida.

À minha segunda família, Antônio, Neli, Eduardo, Bruna e Lavínia, por todo o carinho.

*“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.”*

*Antoine de Saint-Exupéry*

## Resumo

PADILHA, Aline Costa. **Toxicidade e efeito subletal de inseticidas e formulações de iscas tóxicas sobre *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)** 2019. 152f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo desse trabalho foi conhecer: i) a toxicidade aguda letal dos inseticidas acetamiprido (Mospilan<sup>®</sup>), malationa (Malathion<sup>®</sup> 1000 EC), fosmete (Imidan<sup>®</sup>) e espinosade (Tracer<sup>®</sup>); ii) o efeito de concentrações subletais na atividade locomotora, de voo e na percepção ao alimento e, iii) a toxicidade, atratividade e repelência de atrativos alimentares e iscas tóxicas sobre operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi*. Através de ensaios laboratoriais obteve-se a concentração e dose letal média (CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub>) e a sobrevivência média após a exposição oral e tópica das abelhas aos inseticidas. As operárias foram expostas, via oral, à duas concentrações subletais (CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub>) dos inseticidas. Avaliou-se a velocidade média das operárias em um percurso de 50 cm e a capacidade de decolagem em direção a uma fonte de luz. A sensibilidade à sacarose foi avaliada através do reflexo de extensão da probóscide (REP) não condicionado. Obteve-se a CL<sub>50</sub> e a sobrevivência média das operárias após a exposição aos atrativos alimentares Anamed<sup>®</sup> puro, Biofruit<sup>®</sup> (3%), Flyral<sup>®</sup> (1,25%), Melaço de cana-de-açúcar (7%) e Samaritá Tradicional<sup>®</sup> (3%), associados aos inseticidas espinosade e malationa, e as iscas tóxicas Success<sup>®</sup> 0,02CB e Gelsura<sup>®</sup>. No campo, foram realizados testes de atratividade e repelência aos atrativos alimentares associados aos inseticidas e às formulações de iscas tóxicas sobre o forrageamento das operárias. Os valores de CL<sub>50</sub> variaram de 4,96 a 4204,06 ng i.a./ $\mu$ L de dieta para *P. emerina* e de 5,65 a 9841,32 ng i.a./ $\mu$ L de dieta para *T. fiebrigi*; a ordem decrescente de toxicidade para ambas espécies foi espinosade > malationa > fosmete > acetamiprido. Os valores de DL<sub>50</sub> variaram de 1,90 a 6216,55 ng a.i./abelha para *P. emerina* e de 29,29 a 1421,23 ng a.i./abelha para *T. fiebrigi*; a ordem decrescente de toxicidade para *P. emerina* foi espinosade > malationa > fosmete > acetamiprido, entretanto para *T. fiebrigi* foi malationa  $\geq$  espinosade > fosmete > acetamiprido. Malationa, fosmete e espinosade foram classificados como altamente tóxicos para as abelhas, enquanto que acetamiprido foi classificado como moderadamente tóxico. As concentrações subletais dos inseticidas reduziram a velocidade média das abelhas no túnel, bem como a capacidade de decolagem, quatro horas após a contaminação. Acetamiprido e espinosade afetaram a atividade locomotora e de voo, 24 horas após a exposição. Abelhas contaminadas com

acetamiprido e malationa apresentaram o menor número de indivíduos com resposta de REP positiva em relação as abelhas não contaminadas. Melaço de cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional® associados ao espinosade apresentaram elevada toxicidade com CL<sub>50</sub> de 6,92 e 10,61 ng/μL de dieta para *P. emerina* e 4,37 e 15,48 ng/μL de dieta para *T. fiebrigi*, respectivamente. Gelsura® e os atrativos associados à malationa reduziram a sobrevivência média das abelhas por período inferior à 3 horas após a exposição. Nenhuma formulação de isca tóxica foi atrativa para forrageiras de *P. emerina* no campo. Anamed®, Gelsura® e Success® foram repelentes ao forrageio de *P. emerina*.

**Palavras-chave:** abelhas sem ferrão, toxicidade, atrai e mata, efeitos subletais, atratividade e repelência

## Abstract

PADILHA, Aline Costa. **Toxicity and sublethal effect of insecticides and toxic baits formulations to *Plebeia emerina* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)** 2019. 152f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The aim of this study was to know: i) the acute lethal toxicity of commercial formulations of acetamiprid (Mospilan®), malathion (Malathion® 1000 EC), phosmet (Imidan®) and spinosad (Tracer®); ii) the effect of sublethal concentrations of these insecticides on locomotor, flight and food perception and, iii) toxicity, attraction and repellency of food attractions and toxic baits on workers of *P. emerina* and *T. fiebrigi*. Through laboratory tests obtained the median lethal concentration and median lethal dose (LD50 and LC50) and the average survival of workers after oral and topical exposure of bees to insecticides. Workers were orally-exposed to two sublethal concentrations (LC10 and LC50) of the insecticides. We evaluated the average speed of the workers to go through a transparent tunnel 50 cm, and take-off capacity toward a light source. Sensitivity to sucrose assessed by unconditioned proboscis extension reflex (PER). We obtained the mean lethal concentration (LC50) and the mean survival of workers after exposure to Anamed® pure, Biofruit® (3%), Flyral® (1,25%), sugar cane molasses (7%) and Samaritá Tradicional® (3%), associated with spinosad and malathion, and ready-to-use toxic baits Success® 0,02CB and Gelsura®. In the field, tests were carried out on attraction and repellency to lures with insecticides and toxic baits on the workers foraging. There was a significant difference in susceptibility to insecticides between species. The LC50 values ranged from 4.96 to 4204.06 ng a.i./µL of diet for *P. emerina* and from 5.65 to 9841.32 ng a.i./µL of diet for *T. fiebrigi*; the decreasing order of toxicity for both species was spinosad > malathion > phosmet > acetamiprid. The LD50 values ranged from 1.90 to 6216.55 ng a.i./bee for *P. emerina* and from 29.29 to 1421.23 ng a.i./bee for *T. fiebrigi*; the decreasing order of toxicity to *P. emerina* was spinosad > malathion > phosmet > acetamiprid, however for *T. fiebrigi* the order of toxicity was: malathion spinosad > phosmet > acetamiprid. Spinosad, despite the high toxicity, took longer to kill 50% of population. Malathion, phosmet and spinosad were classified highly toxic to bees, while acetamiprid was classified moderately toxic. LC10 and LC50 of insecticides reduced the average speed of the bees in the tunnel, as well the take-off capacity, four hours after the contamination. Acetamiprid and spinosad affected locomotor and flight activity 24 hours after exposure. Workers contaminated with acetamiprid and malathion had the lowest number of individuals with positive PER responses to uncontaminated bees. Sugarcane molasses and Samaritá Traditional® associated with spinosad showed high toxicity with LC50 of 6.92 and 10.61 ng/µL of diet for *P. emerina* and 4.37 and

15.48 ng/ $\mu$ L of diet for *P. emerina* and *T. fiebrigi*, respectively. Gelsura® and baits associated with malathion reduced the average survival of bees for less than 3 hours after exposure. No toxic bait formulation was attractive to *P. emerina* forage in the field. Anamed®, Gelsura® and Success® were repellent to *P. emerina* foraging.

**Key-words:** stingless bees, toxicity, attract and kill, sublethal effects, attraction and repellency.

## Lista de Figuras

### Artigo 1

- Figura 1. Curvas de sobrevivência para *Plebeia emerina* (A) e *Tetragonisca fiebrigi* (B) expostas via oral à acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade.....59
- Figura 2. Curvas de sobrevivência para *Plebeia emerina* (A) e *Tetragonisca fiebrigi* (B) expostas via tópica à acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade.....60

### Artigo 2

- Figura 1. Túnel de atividade locomotora.....87
- Figura 2. Caixa de madeira com tampa de vidro para avaliação da atividade de voo (decolagem) das abelhas.....88
- Figura 3. (A) Desenho das cápsulas plásticas confeccionadas a partir de tubos Eppendorf® para acondicionar as abelhas no experimento de Reflexo de Extensão da Probóscide. (B) Operária de *Tetragonisca fiebrigi* na cápsula presa por uma tira de silicone. (C) Operária de *Plebeia emerina* com a probóscide estendida em direção ao alimento... ..89
- Figura 4. Atividade locomotora de *Plebeia emerina* (P.e.) e *Tetragonisca fiebrigi* (T.f.) 4 e 24 horas após a exposição oral aos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade. ....90
- Figura 5. Atividade de voo de forrageiras de *Plebeia emerina* 4 e 24 horas após exposição oral aos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade.....91

Figura 6.	Atividade de voo de forrageiras de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> 4 e 24 horas após exposição oral aos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade.....	92
-----------	---	----

### Artigo 3

Figura 1.	Estações de treinamento de abelhas sem ferrão. (A) Estações sobre baldes de plástico. (B) Detalhes: papel de filtro para essência, recipiente de armazenamento de sacarose e placa de acrílico contendo ranhuras para alimentação de abelhas. (C) Forrageira de <i>P. emerina</i> se alimentando .....	131
Figura 2.	Placas utilizadas para o teste de atratividade de iscas tóxicas ao forrageamento de <i>Plebeia emerina</i> . (A) Placa contendo o controle, sacarose (50% v/v). (B) Placa contendo atrativo sem inseticida. (C) Placa contendo atrativo com inseticida.....	132
Figura 3.	Placas utilizadas para o teste de repelência de iscas tóxicas ao forrageamento de <i>Plebeia emerina</i> . (A) Placa contendo o controle, água destilada. (B) Placa contendo atrativo Flyral® sem inseticida. (C) Placa contendo atrativo Anamed® sem inseticida.....	133
Figura 4.	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Plebeia emerina</i> expostas oralmente às formulações de iscas tóxicas. ....	134
Figura 5.	Curvas de sobrevivência de operárias de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> expostas oralmente às formulações de iscas tóxicas. ....	135
Figura 6.	Repelência de atrativos alimentares e formulações de iscas tóxicas a base de malationa ao forrageamento de <i>Plebeia emerina</i> .....	136
Figura 7.	Repelência de atrativos alimentares e formulações de iscas tóxicas a base de espinosade ao forrageamento de <i>Plebeia emerina</i> .....	137
Figura 8.	Repelência de iscas tóxicas de pronto uso ao forrageamento de <i>Plebeia emerina</i> .....	138

## Lista de Tabelas

### Artigo 1

- Tabela 1. Inseticidas utilizados nos bioensaios de toxicidade letal sobre *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*. .....55
- Tabela 2. Concentração letal média (CL<sub>50</sub> ng i.a./μL de dieta) de acetamiprido, fosmete, malationa e espinosade, expostos via oral às operárias de *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*. .....57
- Tabela 3. Dose letal média (DL<sub>50</sub> ng i.a./μL de dieta) de acetamiprido, fosmete, malationa e espinosade, expostos via tópica às operárias de *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*. .....58

### Artigo 2

- Tabela 1. Número médio (± EP) de respostas do reflexo da extensão da probóscide (REP) de *Plebeia emerina* à sacarose após a exposição via oral de acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade 24 horas após a intoxicação. ....85
- Tabela 2. Número médio (± EP) de respostas do reflexo da extensão da probóscide (REP) de *Tetragonisca fiebrigi* à sacarose após a exposição via oral de acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade 24 horas após a intoxicação. ....86

### Artigo 3

- Tabela 1. Concentração letal média (CL<sub>50</sub> ng i.a./μL de dieta) de formulações de iscas tóxicas contendo malationa, expostas via oral à operárias de *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*. ..... 127

Tabela 2.	Concentração letal média (CL <sub>50</sub> ng i.a./μL de dieta) de formulações de iscas tóxicas contendo espinosade, expostas via oral à operárias de <i>Plebeia emerina</i> e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> .....	128
Tabela 3.	Número médio (± SE) de forrageiras de <i>Tetragonisca fiebrigi</i> se alimentando em cada alimentador. ....	129
Tabela 4.	Número médio (± SE) de forrageiras de <i>Plebeia emerina</i> atraídas e se alimentando em cada alimentador. ....	130

## Sumário

<b>1. Introdução Geral .....</b>	<b>18</b>
<b>2. Artigo 1 - Toxicidade de inseticidas sobre abelhas sem ferrão neotropicais <i>Plebeia emerina</i> (Friese) e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).....</b>	<b>25</b>
Resumo .....	27
Introdução .....	28
Material e Métodos .....	30
Resultados .....	35
Discussão .....	38
Agradecimentos .....	44
Referências.....	44
<b>3. Artigo 2 - Efeito subletal de inseticidas sobre o comportamento de abelhas sem ferrão <i>Plebeia emerina</i> (Friese) e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).....</b>	<b>61</b>
Resumo .....	63
Introdução .....	64
Material e Métodos .....	65
Resultados .....	70
Discussão .....	73
Agradecimentos .....	77
Referências.....	78
<b>4. Artigo 3 - Toxicidade, atratividade e repelência de iscas tóxicas às abelhas sem ferrão <i>Plebeia emerina</i> (Friese) e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).....</b>	<b>93</b>

Resumo .....	95
1. Introdução .....	95
2. Material e Métodos .....	98
3. Resultados .....	105
4. Discussão .....	109
5. Conclusão .....	116
6. Agradecimentos .....	120
7. Referências.....	117
<b>5. Considerações finais.....</b>	<b>139</b>
<b>Referências.....</b>	<b>142</b>

## 1. Introdução Geral

A polinização é um dos primeiros e mais importantes passos na produção de frutas sendo fundamental para a produção agrícola (OLLERTON et al., 2011; KLATT et al. 2013; GARRATT et al. 2014; IPBES, 2016; JUNQUEIRA; AUGUSTO, 2017). Esse serviço ecológico vital é realizado principalmente por abelhas, as quais são reconhecidas como o grupo de polinizadores mais abundante na agricultura (KEVAN; BAKER 1983; KLEIN et al., 2007; MICHENER, 2007; POTTS et al., 2010). Nas regiões tropicais, 70% do total de 1.330 cultivos polinizados por animais produzem frutos e sementes em maior quantidade e/ou com melhor qualidade quando polinizadas adequadamente (ROUBIK, 2018).

A abelha doméstica, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), têm sido a mais utilizada em todo o mundo para a polinização de frutíferas, em virtude da sua ampla distribuição geográfica, facilidade de criação e manejo, grande quantidade de abelhas campeiras por colmeia e sua capacidade de visitar um número elevado de flores a cada dia de trabalho (PATRON, 2010). Entretanto, com o declínio das populações dessa espécie, surgiu grande preocupação com a estabilidade dos serviços de polinização e suas consequências na produção de alimentos no mundo (DELAPLANE; MAYER, 2000; POTTS, 2010; VENTURIERI et al., 2011; GIANNINI et al., 2015a; GARIBALDI et al., 2016).

As abelhas silvestres são uma alternativa viável para se utilizar em serviços de polinização, devido à elevada riqueza de espécies, grande variedade de tamanhos e hábitos ecológicos, o que possibilita a polinização de grande número de plantas (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2006; GIANNINI et al., 2015b; WITTER et al. 2014, 2015). As abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) também conhecidas

como meliponíneos compõem o grupo mais diversificado de abelhas sociais e são importantes polinizadoras de plantas cultivadas e nativas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (HEARD, 1999; MICHENER, 2007; WITTER et al., 2014).

Uma característica deste grupo é o ferrão atrofiado (vestigial) que não atua como estrutura de defesa, está presente apenas nas fêmeas, sendo uma modificação do ovipositor. Os ninhos são construídos principalmente em ocós de árvores utilizando diversos materiais da natureza, como resinas vegetais e barro, coletados pelas operárias. As fêmeas operárias possuem corbícula, estrutura fundamental para transportar os grãos de pólen das flores ou outras substâncias utilizadas na alimentação e na construção de seus ninhos (NOGUEIRA-NETO, 1997; MICHENER, 2013; WITTER; BLOCHTEIN, 2009; WITTER; NUNES-SILVA, 2014).

Quando criadas racionalmente, muitas espécies de meliponíneos são relevantes na produção de mel e na melhoria da produção agrícola, através dos serviços de polinização que proporcionam (CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006; SLAA et al., 2006). Além disso, a meliponicultura apresenta-se como uma excelente alternativa de geração de renda para a agricultura familiar, pois é ecologicamente correta, de baixo custo inicial e com boas perspectivas de retorno financeiro (MAGALHÃES; VENTURIERI, 2010).

O gênero *Plebeia* Schwarz (1938), conhecido popularmente como abelha mirim, é o segundo gênero de Meliponini com maior número de espécies descritas e constitui um grupo amplamente distribuído na região Neotropical (MICHENER, 2013). Devido à ausência de ferrão funcional, baixa agressividade, menor tamanho populacional das colônias e menor amplitude do voo de forrageamento, as abelhas mirins são adequadas para a polinização de culturas agrícolas em áreas povoadas ou em ambientes protegidos (SLAA et al., 2006; VENTURIERI et al., 2011). Nesse contexto, destaca-se a espécie *Plebeia emerina* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae) como agente complementar na polinização de frutíferas importantes incluindo a macieira e morangueiro (ORTH, 1984; ORTOLAN; LAROCCA, 1996; WITTER et al., 2014; PIOVESAN, 2018).

A abelha Jataí *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz, 1938) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) é a espécie mais popular na meliponicultura e que produz um dos méis mais procurados sendo uma das espécies de Meliponini mais comumente mantidas nos três biomas brasileiros (Pampa, Mata Atlântica e Pantanal). Além disso, mostraram-

se excelentes polinizadoras de diversas culturas, evidenciando a possibilidade do estabelecimento de consórcio entre produção de frutas e a meliponicultura (WITTER et al., 2014).

O Brasil ocupa a terceira colocação no *ranking* da produção mundial de frutas, com uma produção que supera os 40 milhões de toneladas (FAO, 2018). Diversas frutíferas são cultivadas em todas as regiões do Brasil, mas há uma especialização em função do clima (ALMEIDA, 2008). Na região Sul do Brasil, a cultura da macieira (*Malus domestica* Borkh) destaca-se como uma das mais importantes. A cultura possui alta dependência da polinização cruzada para que seja obtida produção comercial satisfatória, pois apresenta muitas cultivares com alto grau de incompatibilidade (BROOThAERTS et al., 2004; PETRI et al., 2008). Assim, a sincronia de floração entre diferentes cultivares e a intensa atividade de polinizadores são fundamentais para que se tenha uma polinização eficaz e uma fertilização bem sucedida (PAUDEL et al., 2015).

No entanto, para que a produção de frutos nos pomares seja satisfatória, além da polinização eficiente é fundamental o manejo de pragas e doenças. Na cultura da macieira, uma das principais espécies de insetos praga é a mosca-das-frutas sul-americana, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) (NORA; HICKEL, 2006). O controle de adultos de *A. fraterculus* consiste, principalmente, na utilização de inseticidas organofosforados em pulverização em cobertura nos pomares, com destaque para malationa e fosmete (KOVALESKI et al., 2000; RIBEIRO, 2010; RAGA; SATO, 2016). Entretanto, inseticidas deste grupo químico apresentam elevada toxicidade para humanos, período de carência, além de baixa seletividade aos inimigos naturais e insetos polinizadores (DEVILLERS, 2003; BOTTON et al., 2016; CASTILHOS et al., 2013; 2017).

Recentemente, novos grupos químicos foram introduzidos para o manejo das moscas-das-frutas (VILLAVERDE et al., 2014). Dentre os novos inseticidas, alternativos aos Organofosforados, destacam-se o espinosade e o acetamiprido (URBANEJA et al., 2009). Estudos anteriores apresentaram resultados promissores desses inseticidas na mortalidade de adultos de *A. fraterculus* (SCOZ et al., 2004; NONDILLO et al., 2007; RAGA; SATO, 2006, 2011). Além disso, iscas tóxicas a base de espinosade, tem sido utilizadas no manejo de moscas-das-frutas (RAGA, SATO; 2005; MANGAN, 2009; FLORES et al., 2011).

O emprego de iscas tóxicas para o controle da mosca-das-frutas tem sido preconizado pelo Manejo Integrado de Pragas (MIP) como a principal alternativa ao uso de inseticidas aplicados em cobertura (STARK et al., 2004; CHUECA et al., 2007; RUIZ et al., 2008; BORGES et al., 2015). Por serem utilizadas em pequeno volume por hectare e aplicadas em pontos específicos dos pomares, as iscas tóxicas podem possibilitar uma menor contaminação de insetos benéficos (CABRERA-MARÍN et al., 2016). A isca tóxica pode ser formulada na propriedade, misturando atrativo alimentar com agente letal (inseticida) ou por meio de formulações prontas para o uso.

O melaço de cana-de-açúcar é o principal atrativo alimentar usado para formular iscas tóxicas no sul do Brasil, os açúcares atuam como fagoestimulantes, aumentando a quantidade de isca ingerida pelos insetos adultos (NESTEL et al., 2004; HÄRTER et al., 2010). As proteínas hidrolisadas são outra fonte alimentar que pode ser empregada em iscas tóxicas para o controle de *A. fraterculus* (BORGES et al., 2015; RAGA; SATO, 2016). No Brasil, destacam-se as proteínas hidrolisadas Biofruit<sup>®</sup>, Samaritá Tradicional<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup> (BOTTON et al., 2016). O atrativo alimentar, Anamed<sup>®</sup> composto de atrativos de origem vegetal, açúcares fagoestimulantes, emulsão inerte de óleos e ceras, também tem sido utilizado para o controle de moscas-das-frutas tendo como principal vantagem o incremento da persistência dos atrativos e do inseticida principalmente em períodos chuvosos (BORGES et al., 2015).

No caso das formulações de pronto uso, o espinosade está disponível na isca comercial Success<sup>®</sup> 0,02 CB (Dow Agrosiences Industrial Ltda.) registrada para o controle de *A. fraterculus*, *A. obliqua* (Macquat), *Bactrocera carambolae* (Drew & Hancock) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann) nas culturas de abacate, cacau, citros, kiwi, maçã, mamão, manga, maracujá e romã (BRASIL, 2018). Em outros países, esta isca tóxica é conhecida como GF-120 e é recomendada para uso na produção orgânica pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2010). Além disso, Success<sup>®</sup> tem sido utilizado com sucesso no controle de várias espécies de moscas-das-frutas no mundo, sendo a isca tóxica padrão empregada em programas de erradicação de moscas-das-frutas (STARK et al., 2004; CHUECA et al., 2007; RUIZ et al., 2008; DIAZ-FLEISCHER et al., 2017; FLORES et al., 2017).

A isca tóxica para pronto uso Gelsura<sup>®</sup> (BASF S/A) encontra-se em fase de pesquisa no Brasil (BOTTON et al., 2016). Essa isca é composta de um gel concentrado em uma matriz de polímeros contendo atrativos alimentares, trimedlure

(paraferomônio) e alfa-cipermetrina como agente letal (RUIZ, 2013). Por possuir em sua formulação um paraferomônio, Gelsura® tem se mostrado uma alternativa promissora para a supressão populacional de *C. capitata* (BARÔNIO et al., 2018; VARGAS et al., 2018).

Apesar dos esforços do Manejo Integrado em buscar alternativas para o controle eficiente de pragas, várias espécies de abelhas estão sofrendo grandes declínios populacionais, o que suscita discussões sobre possíveis consequências nas práticas agrícolas globais e na produção de alimentos (GIANNINI et al., 2015a; PIRES et al., 2016). O uso insustentável dos agroecossistemas e o excesso de agrotóxicos são considerados as principais causas de perdas na diversidade de abelhas (WIEST et al., 2011; NICHOLLS; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014). Como exemplo, podem ser destacados os inseticidas dos grupos químicos Organofosforados e Neonicotinoides, os quais apresentam amplo espectro de ação e alta toxicidade aos insetos benéficos, podendo estar diretamente relacionados ao declínio das populações dos polinizadores (BECHER et al., 2013; GODFRAY et al., 2014; GOULSON et al., 2015).

A sobrevivência das abelhas depende diretamente das atividades externas aos ninhos, as quais tornam possível a coleta de água, alimentos, uma grande variedade de recursos, principalmente produtos vegetais, como pólen, néctar, resina, látex, folhas, pelos de plantas, fragrâncias, óleos, sementes, além de fezes de animais, barro e esporos fúngicos, entre outros produtos não vegetais (ROUBIK, 1989; ELTZ et al., 2002; WITTER; BLOCHTEIN, 2009). Durante as épocas de baixo recurso floral ou em momentos em que as abelhas estão coletando resinas ou outros materiais, nos pomares e em áreas adjacentes, as iscas tóxicas podem se tornar atrativas as abelhas, por serem fontes de açúcares e proteínas, as quais são base da alimentação da colmeia.

Mangan e Moreno (2009) relatam que os componentes usados na isca tóxica de pronto uso GF-120 não foram atrativos ao forrageio de *A. mellifera*. Entretanto, estudos realizados com GF-120 e Success, mostraram que essa isca tóxica de pronto uso não desencorajou o forrageamento de *A. mellifera* e da abelha sem ferrão *Plebeia moureana* (SANCHEZ et al., 2012; GOMÉZ-ESCOBAR et al., 2014; ROSA, 2016). Devido as informações contrastantes entre as diferentes espécies de abelhas em relação a atratividade ou não desses compostos, são necessários estudos que avaliem esses fatores em abelhas nativas brasileiras.

Quando forrageiam em ambientes cultivados, as abelhas sem ferrão são expostas a diversas substâncias potencialmente tóxicas utilizadas para o controle de pragas, como herbicidas, fungicidas e inseticidas (SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2016). A toxicidade de inseticidas para as abelhas tem como base a determinação de uma dose média letal (DL<sub>50</sub>) ou uma concentração média letal (CL<sub>50</sub>) representando, respectivamente, uma dose ou concentração capaz de causar a mortalidade de 50% da população experimental (DESNEUX et al., 2007; GUEDES et al., 2016). Além de considerar a mortalidade letal, é importante analisar os efeitos denominados subletais, que não provocam diretamente a mortalidade, mas que podem estar associadas ao comprometimento das atividades dos indivíduos e, conseqüentemente, ao declínio da colônia (THOMPSON; MAUS, 2007; FREITAS, PINHEIRO, 2010).

Como *A. mellifera* é um dos principais agentes responsáveis pelos serviços de polinização no mundo (DELAPLANE; MAYER, 2000) e é considerada um inseto padrão utilizado em experimentos toxicológicos (FELTON et al., 1986; DEVILLERS et al., 2002), os protocolos de toxicidade de agrotóxicos elaborados por agências europeias e americanas são descritos e padronizados utilizando somente essa espécie como modelo teste (FELTON et al., 1986; OECD, 1998a, 1998b; OEPP/EPPO, 2001). Devido a isso, diversos estudos foram realizados com o objetivo de identificar agrotóxicos seletivos à abelha melífera (GARY; MUSSEN, 1984; ATKINS, 1992; IWASA et al., 2004; DELAPLANE; MAYER, 2005; KARISE et al., 2007; CARVALHO et al., 2009; MEDRZYCKI et al., 2013; COSTA et al., 2014; JOHNSON, 2015; STANLEY et al., 2015; DAI, 2017), gerando ampla informação a respeito de uma única espécie polinizadora dentre aproximadamente 25.000 existentes no mundo (FAO, 2004).

No entanto, as abelhas fazem parte de um grupo muito diversificado, distribuídos em diferentes grupos taxonômicos e apresentam vulnerabilidade variada aos agrotóxicos (DESNEUX et al., 2007; ALSTON et al., 2007; DEL SARTO et al., 2014). Dessa forma, a avaliação de toxicidade de agrotóxicos em outros grupos de abelhas deve ser considerada. Recentemente, estudos têm demonstrado alta toxicidade aguda letal de inseticidas sobre abelhas nativas (SOARES et al., 2015; TOMÉ et al., 2015; DORNELES et al., 2017) e graves distúrbios, tanto em nível de colônia como de indivíduo decorrentes da exposição prolongada a baixas doses ou

concentrações de inseticidas (DOS SANTOS et al., 2016; TOSI et al. 2017; ALKASSAB; KIRCHNER, 2018; SIVITER et al. 2018).

Haja vista a importância das abelhas nativas como complemento e/ou alternativa nos serviços de polinização e a escassez de estudos toxicológicos de inseticidas e formulações de iscas tóxicas nessas espécies, este trabalho teve como objetivos conhecer: i) a toxicidade aguda letal dos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade; ii) os efeitos de concentrações subletais sobre a atividade locomotora, de voo e a percepção à sacarose e iii) toxicidade, atratividade e repelência de formulações de iscas tóxicas sobre as abelhas sem ferrão *P. emerina* e *T. fiebrigi*.

## **2. Artigo 1 - Ecotoxicology**

Versão em português

**Toxicidade de inseticidas sobre abelhas sem ferrão neotropicais *Plebeia emerina* (Friese) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**

Aline Costa Padilha, Bruna Piovesan, Máira Chagas Morais, Juliano de Bastos Pazini, Moisés João Zotti, Marcos Botton, Anderson Dionei Grützmacher

1 Toxicidade de inseticidas sobre abelhas sem ferrão neotropicais *Plebeia emerina* (Friese) e  
2 *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)

3

4

5 AC PADILHA<sup>1\*</sup>, B PIOVESAN<sup>1</sup>, MC MORAIS<sup>1</sup>, J de B PAZINI<sup>1</sup>, MJ ZOTTI<sup>1</sup>, M  
6 BOTTON<sup>2</sup>, AD GRÜTZMACHER<sup>1</sup>

7

8

9 <sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM),  
10 Departamento de Fitossanidade (DFs)

11

12 <sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Embrapa Uva e Vinho

13

14 \*Autor para correspondência. Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Departamento de

15 Fitossanidade, Avenida Eliseu Maciel, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Capão-do-Leão,

16 RS, Brasil, tel: +55 53 3275 7376 ou +55 53 9940 2888, fax: +55 53 3275 9031, e-mail:

17 acostapadilha08@gmail.com

18

19

20

21

22

23

24

25 *Título curto: Toxicidade de inseticidas sobre *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi**

26 *Resumo*

27

28 O uso de agrotóxicos nos agroecossistemas é considerado uma das principais causas da perda  
29 de diversidade de abelhas na região Neotropical, onde *Plebeia emerina* (Friese) e  
30 *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) são importantes  
31 polinizadores de plantas nativas e cultivadas. O objetivo desse trabalho foi conhecer a  
32 toxicidade aguda letal dos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade sobre *P.*  
33 *emerina* e *T. fiebrigi*. Obteve-se a concentração e a dose letal média (CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub>) e a  
34 sobrevivência média das operárias após a exposição oral e tópica aos inseticidas. Os valores  
35 de CL<sub>50</sub> variaram de 4,96 a 4204,06 ng i.a./μL de dieta para *P. emerina* e de 5,65 a 9841,32  
36 ng i.a./μL de dieta para *T. fiebrigi*; a ordem decrescente de toxicidade para ambas as espécies  
37 foi espinosade > malationa > fosmete > acetamiprido. Os valores de DL<sub>50</sub> variaram de 1,90 a  
38 6216,55 ng i.a./abelha para *P. emerina* e de 29,29 a 1421,23 ng i.a./abelha para *T. fiebrigi*; a  
39 ordem decrescente de toxicidade foi espinosade > malationa > fosmete > acetamiprido para *P.*  
40 *emerina*; e malationa ≥ espinosade > fosmete > acetamiprido, para *T. fiebrigi*. A  
41 sobrevivência média das abelhas contaminadas por malationa, fosmete e espinosade, via oral  
42 e tópica, foi inferior à 24 horas. Malationa, fosmete e espinosade foram classificados como  
43 altamente tóxicos, enquanto que acetamiprido foi classificado como moderadamente tóxico.  
44 Os resultados indicam que os inseticidas testados são potencialmente perigosos para *P.*  
45 *emerina* e *T. fiebrigi*, tornando essenciais propostas de medidas para minimizar o impacto  
46 destes aos polinizadores nativos.

47

48 *Palavras-chave:* controle químico, efeito letal, avaliação de risco, abelhas nativas,  
49 polinização.

50

51 *Introdução*

52

53 A polinização é um dos primeiros e mais importantes passos na produção de frutas e  
54 para aproximadamente 90% das angiospermas (Ollerton et al. 2011), além de aumentar a  
55 qualidade dos frutos e, conseqüentemente, o valor econômico da produção agrícola (Klatt et  
56 al. 2013; Garratt et al. 2014). Esse serviço ecológico vital é realizado principalmente por  
57 abelhas, as quais são reconhecidas como os principais e mais eficientes agentes polinizadores  
58 (Michener 2007; Potts et al. 2010).

59 *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae), têm sido a espécie mais utilizada na  
60 polinização de frutíferas. Entretanto, com o declínio das populações dessa espécie, surgiu  
61 grande preocupação com a estabilidade dos serviços de polinização e suas conseqüências na  
62 produção de alimentos no mundo (Potts et al. 2010; Giannini et al. 2015a; Pires et al. 2016).

63 As abelhas silvestres são uma alternativa para se utilizar em serviços de polinização,  
64 devido à elevada riqueza de espécies, grande variedade de tamanhos e hábitos ecológicos, o  
65 que possibilita a polinização de grande número de plantas (Imperatriz-Fonseca et al. 2006;  
66 Giannini et al., 2015b). As abelhas sem ferrão, pertencente à tribo Meliponini, constituem o  
67 grupo mais diversificado de abelhas sociais e são polinizadoras de plantas nativas e cultivadas  
68 em regiões tropicais e subtropicais do mundo e são consideradas promissoras para o uso na  
69 fruticultura (Slaa et al. 2006; Michener 2007; Witter et al. 2014).

70 O gênero *Plebeia* Schwarz, conhecido popularmente como abelha mirim, é o segundo  
71 gênero de Meliponini com maior número de espécies descritas, constituindo um grupo  
72 amplamente distribuído na região Neotropical (Michener 2013). Devido à ausência de ferrão  
73 funcional, baixa agressividade, menor tamanho populacional das colônias e menor amplitude  
74 do voo de forrageamento, as abelhas mirins são adequadas para a polinização de culturas  
75 agrícolas em áreas povoadas ou em ambientes protegidos (Slaa et al. 2006; Venturieri et al.

76 2011). Nesse contexto, destaca-se a espécie *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera: Apidae:  
77 Meliponini) como agente complementar na polinização de frutíferas tais como macieira e  
78 morangueiro (Orth 1984; Ortolan e Laroca 1996; Piovesan 2018).

79 As abelhas sem ferrão podem ser criadas racionalmente e muitas espécies são  
80 promissoras na produção e comercialização de mel, bem como na melhoria da produção  
81 agrícola devido aos serviços de polinização que podem proporcionar para as culturas  
82 (Cortopassi-Laurino et al. 2006; Slaa et al. 2006). O mel de meliponíneos tem maior valor  
83 ecológico e comercial quando comparado com mel da espécie *A. mellifera*, tornando-se uma  
84 alternativa para agregar valor econômico aos agroecossistemas brasileiros, de forma  
85 sustentável (Araújo et al. 2010; Magalhães e Venturieri 2010)

86 A abelha Jataí, *Tetragonisca* Moure, é bastante popular na meliponicultura e produz  
87 um dos méis mais procurados (Oliveira et al. 2013). As abelhas deste gênero de Meliponini  
88 são comumente encontradas em três biomas brasileiros (Pampa, Mata Atlântica e Pantanal)  
89 (Camargo e Pedro 2013). A espécie *Tetragonisca fiebrigi* está presente nos estados do Rio  
90 Grande Sul, Santa Catarina e Paraná sendo visitante floral de plantas nativas e cultivadas, como  
91 morangueiro e canola, proporcionando o estabelecimento do consórcio entre a produção de  
92 mel e de frutas (Camargo e Pedro 2013; Vossler et al. 2014; Witter et al. 2014).

93 Várias espécies de abelhas estão sofrendo grandes declínios populacionais, o que  
94 suscita discussões sobre possíveis consequências nas práticas agrícolas globais e na produção  
95 de alimentos (Goulson et al. 2015; Giannini et al. 2015a). O uso insustentável dos  
96 agroecossistemas e o excesso de agrotóxicos são considerados as principais causas de perdas  
97 na diversidade de abelhas (Wiest et al. 2011; Nicholls e Altieri 2013; Sanchez-Bayo e Goka  
98 2014). Como exemplo, podem ser destacados os inseticidas dos grupos químicos  
99 Organofosforado e Neonicotinoide, os quais apresentam amplo espectro de ação e alta  
100 toxicidade, podendo estar diretamente relacionados ao declínio das populações dos

101 polinizadores (Becher et al. 2013; Godfray et al. 2014; Goulson et al. 2015). Dentre os novos  
102 inseticidas, alternativos aos sintéticos, destaca-se o espinosade (Urbaneja et al. 2009), produto  
103 derivado da fermentação aeróbica do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* Mertz e Yao  
104 (Thompson et al. 2000). Este inseticida apresenta baixa toxicidade a mamíferos e peixes, e  
105 maior seletividade aos insetos não alvo (Thompson et al. 2000; Bailey et al. 2005). Contudo,  
106 são escassas as informações dos efeitos desse inseticida sobre os polinizadores nativos, como  
107 as abelhas sem ferrão.

108         As abelhas formam um grupo muito diversificado, distribuídos em diferentes grupos  
109 taxonômicos e apresentam vulnerabilidade variada aos agrotóxicos (Desneux et al. 2007).  
110 Atualmente, encontram-se disponíveis poucas informações nos protocolos internacionais a  
111 respeito de experimentos toxicológicos conduzidos com espécies nativas, por isso, torna-se  
112 necessário o estudo da toxicidade desses produtos sobre abelhas sem ferrão brasileiras. Esse  
113 trabalho teve como objetivo conhecer a toxicidade aguda letal dos inseticidas malationa e  
114 fosmete (Organofosforado), acetamiprido (Neonicotinoide) e espinosade (Espinosa) sobre  
115 operárias das abelhas sem ferrão *P. emerina* e *T. fiebrigi*.

116

## 117 *Material e Métodos*

118

### 119 *Insetos*

120         Foram utilizadas operárias adultas das espécies *P. emerina* e *T. fiebrigi*, criadas no  
121 meliponário da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas  
122 (UFPel) (cadastro SisGen A7B64FD). Para a coleta, foram verificadas as condições de saúde  
123 e o estado fisiológico das abelhas, de acordo com as diretrizes para testes químicos em  
124 abelhas (OECD 1998a,b). Foram coletadas abelhas de três colmeias distintas não parentais,  
125 em dias ensolarados com temperatura acima de 18°C. Operárias de *T. fiebrigi* foram coletadas

126 individualmente com o auxílio de um pinça, enquanto as operárias de *P. emerina* foram  
127 coletadas em grupos através de sugador entomológico. Para as duas espécies foram retiradas  
128 as abelhas que se localizavam na parte superior da colmeia.

129 As abelhas coletadas foram acondicionadas em gaiolas compostas por potes plásticos  
130 transparentes com capacidade de 250 mL (diâmetro interno: 90 x 60 mm; diâmetro externo:  
131 105 x 65 mm), perfurados na parte superior para garantir a troca gasosa. Para a manutenção  
132 das abelhas *P. emerina* e *T. fiebrigi*, a gaiola teve o fundo do pote forrado com papel filtro e  
133 na parte superior foi acoplado um tubo Eppendorf® (1,5 mL) para a oferta do alimento. Após  
134 a coleta, as abelhas foram levadas ao laboratório e mantidas em salas climatizadas  
135 (Temperatura: 28±1 °C; Umidade Relativa: 70±2%; Escotofase de 24 horas). A fim de  
136 minimizar o estresse ocasionado pelo confinamento, previamente ao início dos testes, as  
137 abelhas permaneceram em adaptação por 24 horas, sendo alimentadas com solução de  
138 sacarose (50% v/v).

139

#### 140 *Inseticidas*

141 Quatro formulações comerciais de inseticidas registradas e usadas para o manejo de  
142 pragas na fruticultura brasileira foram selecionadas para a condução dos bioensaios (Brasil  
143 2018; PIC 2018; PIM 2018) (Tabela 1).

144

#### 145 *Bioensaios de toxicidade letal aguda*

146 A toxicidade de inseticidas para as abelhas teve como base a determinação da  
147 concentração letal média (CL<sub>50</sub>) e da dose letal média (DL<sub>50</sub>) representando, respectivamente,  
148 uma concentração ou dose capaz de provocar a mortalidade de 50% da população  
149 experimental. A suscetibilidade das abelhas forrageiras aos inseticidas foi avaliada usando

150 dois métodos de exposição: oral e tópico, utilizando a metodologia adaptada de Felton et al.  
151 (1986), OECD (1998a,b) e Medrzycki et al. (2013).

152 As concentrações para cada inseticida avaliado foram determinadas através de  
153 bioensaios, com base na concentração de ingrediente ativo indicado no rótulo das  
154 formulações. Os testes foram realizados em duas etapas: i) testes preliminares: foram  
155 realizados com o objetivo de reconhecer a faixa das doses com variação de resposta. Foi  
156 estabelecida uma concentração estoque (CE) de 1000 ng i.a./ $\mu$ L para malationa, fosmete e  
157 espinosade e de 100000 ng i.a./ $\mu$ L para acetamiprido. Através de diluições em série (1:10) da  
158 CE em água destilada foram obtidas seis concentrações em ordem decrescente para o  
159 reconhecimento da faixa de doses que proporcionassem variações de mortalidade (0 a 100%  
160 de mortalidade) a serem utilizadas nos testes definitivos; ii) testes definitivos: reconhecida a  
161 faixa de resposta dos testes preliminares, a CE dos inseticidas foi diluída em água destilada  
162 para o estabelecimento de sete a nove doses em concentrações crescentes de seus ingredientes  
163 ativos a serem aplicados.

164

#### 165 *Toxicidade oral*

166 As formulações dos inseticidas diluídas em água destilada, nas diferentes  
167 concentrações, foram veiculadas mediante dieta (sacarose/água, v/v 50%), acondicionadas em  
168 tubos Eppendorf<sup>®</sup> (1,5 mL) com um orifício no fundo de forma que as abelhas tivessem  
169 acesso ao alimento contaminado. As seguintes concentrações mínima e máxima (em ng  
170 i.a./ $\mu$ L) foram usadas nos testes com *P. emerina*: acetamiprido (Mospilan<sup>®</sup>) 625,0 a 50000,0;  
171 malationa (Malathion<sup>®</sup> 1000 EC) 1,0 a 100,0; fosmete (Imidan<sup>®</sup> 500 WP) 60,0 a 200,0 e  
172 espinosade (Tracer<sup>®</sup>) 0,1 a 100,0. As seguintes concentrações mínima e máxima (em ng  
173 i.a./ $\mu$ L) foram usadas nos testes com *T. fiebrigi*: acetamiprido (Mospilan<sup>®</sup>) 500,0 a 50000,0;

174 malationa (Malathion<sup>®</sup> 1000 EC) 1,0 a 200,0; fosmete (Imidan<sup>®</sup> 500 WP) 10,0 a 500,0 e  
175 espinosade (Tracer<sup>®</sup>) 2,0 a 100,0.

176 Para induzir o consumo do alimento oferecido às abelhas, os indivíduos foram  
177 privados de alimentação por um período de duas horas antes do início dos experimentos.  
178 Após o período de jejum, cada grupo de abelhas recebeu 1,00 mL de alimento contaminado,  
179 enquanto o controle 1,00 mL de alimento sem inseticida. Após seis horas de oferta de  
180 alimento contaminado, todos os alimentadores foram substituídos por um novo, contendo  
181 apenas solução de sacarose *ad libitum*. A quantidade de alimento consumida pelo grupo de  
182 abelhas foi obtida através da pesagem do alimentador antes e após a exposição.

183 Para cada tratamento (concentração de inseticida) foram utilizadas três repetições,  
184 cada uma contendo dez abelhas adultas de três diferentes colônias para cada espécie avaliada,  
185 o experimento foi repetido duas vezes no tempo, totalizando 60 abelhas por tratamento. As  
186 gaiolas foram mantidas em sala climatizada (Temperatura: 28°C ± 1°C; Umidade Relativa:  
187 70% ± 2%; Escotofase de 24 horas). As taxas de mortalidade foram observadas 48 horas após  
188 a oferta do alimento contaminado, para a determinação da CL<sub>50</sub>.

189

#### 190 *Toxicidade tópica*

191 Para os bioensaios de toxicidade tópica, a concentração estoque de cada inseticida foi  
192 diluída em uma solução (0,50 mL água/0,50 mL acetona) em concentrações decrescentes. As  
193 seguintes concentrações mínima e máxima (em ng i.a./abelha) foram usadas nos testes com *P.*  
194 *emerina*: acetamiprido (Mospilan<sup>®</sup>) 625,0 a 50000,0; malationa (Malathion<sup>®</sup> 1000 EC) 0,25 a  
195 250,0; fosmete (Imidan<sup>®</sup> 500 WP) 2,5 a 100,0 e espinosade (Tracer<sup>®</sup>) 0,25 a 25,0. As  
196 seguintes concentrações mínima e máxima (em ng i.a./μL) foram usadas nos testes com *T.*  
197 *fiebrigi*: acetamiprido (Mospilan<sup>®</sup>) 156,2 a 25000,0; malationa (Malathion<sup>®</sup> 1000 EC) 5,0 a

198 500,0; fosmete (Imidan<sup>®</sup> 500 WP) 10,0 a 100,0 e espinosade (Tracer<sup>®</sup>) 2,5 a 250,0. Para o  
199 grupo controle utilizou-se o solvente (0,5 mL água/0,5 mL acetona).

200 Antes da aplicação tópica, as abelhas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> por dez segundos.

201 A exposição das abelhas aos inseticidas ocorreu mediante aplicação de 0,50 µL de cada  
202 concentração na região do pronoto de cada inseto com auxílio de um microaplicador manual  
203 Burkard<sup>®</sup> (Burkard Scientific, Rickmansworth, England).

204 Para cada tratamento (concentração de inseticida) foram utilizadas seis repetições,  
205 cada uma contendo dez abelhas adultas de três diferentes colônias para cada espécie avaliada,  
206 totalizando 60 abelhas por tratamento. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada  
207 (Temperatura: 28°C ± 1°C; Umidade Relativa: 70% ± 2%; Escotofase de 24 horas). As taxas  
208 de mortalidade foram observadas 48 horas após a aplicação tópica.

209

210 *Tempo médio de sobrevivência*

211 Para avaliar o tempo de sobrevivência das abelhas após a exposição dos inseticidas  
212 foram utilizadas as formas de exposição: oral e tópica. Os inseticidas foram utilizados na  
213 concentração de 1000 ng/µL de dieta para os bioensaios via oral e 1000 ng/abelha nos  
214 bioensaios tópicos. A exposição dos inseticidas para as abelhas e o delineamento  
215 experimental foram realizados conforme descrito anteriormente para os bioensaios de  
216 toxicidade oral e tópica. As avaliações de mortalidade foram realizadas 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 6,0;  
217 12,0; 24,0 e 48,0 horas após a exposição aos inseticidas.

218

219 *Análises estatísticas*

220 Os pressupostos normalidade e homocedasticidade das variâncias dos dados de  
221 mortalidade e consumo de alimento foram verificadas através do teste de Shapiro-Wilk e  
222 Bartlett, respectivamente. A fim de comparar se houve diferença no consumo do alimento

223 tratado com inseticida, durante a exposição por via oral, utilizou-se ANOVA com Tukey *post*  
224 *hoc* ( $P < 0,05$ ), através do programa R<sup>®</sup> (R Development Core Team 2015).

225 Para a validação dos testes, a mortalidade do grupo controle não excedeu 10% e foi  
226 respeitado o limite de confiança de 95%. Ambos os valores de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub>, bem como o seu  
227 respectivo intervalo de confiança de 95% e valores qui-quadrado foram determinados  
228 empregando-se a função log-logistic do pacote “drc” – Analysis of Dose-Response Curves  
229 compilado pelo programa R<sup>®</sup> (R Development Core Team 2015) (Ritz e Streibig, 2005).

230 Após a obtenção das CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub>, foi possível avaliar a toxicidade dos inseticidas sob  
231 dois aspectos: (I) comparando os valores de CL<sub>50</sub> ou DL<sub>50</sub> de cada inseticida entre as espécies  
232 de abelhas e; (II) comparando os valores das CL<sub>50</sub> ou DL<sub>50</sub> entre os inseticidas para cada  
233 espécie de abelha. Para tanto, em ambos os casos foram utilizados os valores dos intervalos de  
234 confiança de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub>, sendo considerados significativamente diferentes quando não  
235 houve sobreposição desses intervalos, a 95% de probabilidade.

236 Os estimadores de Kaplan-Meier (método de Log-Rank) foram utilizados para avaliar  
237 a sobrevivência (horas) das abelhas e as curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste  
238 de Holm-Sidak ( $P < 0,05$ ) usando o software SigmaPlot versão 12.3 (Systat Software, San  
239 Jose, CA, USA).

240

## 241 *Resultados*

242

243 Os testes de toxicidade aguda realizados com as formulações comerciais de  
244 acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade apresentaram diferentes níveis de toxicidade  
245 para *P. emerina* e *T. fiebrigi*, dependendo do modo de exposição (Tabelas 1 e 2).

246 Os valores de CL<sub>50</sub> para acetamiprido, malationa e fosmete após a exposição oral  
247 foram significativamente diferentes entre *P. emerina* e *T. fiebrigi*, entretanto, os valores de

248 CL<sub>50</sub> para espinosade não diferiram entre as espécies de abelhas sem ferrão (Tabela 2). Os  
249 valores de CL<sub>50</sub> variaram de 4,96 a 4204,06 ng i.a./ $\mu$ L de dieta para *P. emerina* e de 5,65 a  
250 9841,32 ng i.a./ $\mu$ L de dieta para *T. fiebrigi*; a ordem de toxicidade para ambas espécies (em  
251 ordem decrescente) foi espinosade > malationa > fosmete > acetamiprido. As diferenças  
252 significativas nos valores de CL<sub>50</sub> foram evidenciadas mediante a não sobreposição dos  
253 intervalos de confiança de 95% (Tabela 2).

254 As duas espécies de abelhas não apresentaram diferença no consumo do alimento com  
255 adição de inseticida, quando comparado aos seus grupos controles (solução de sacarose sem  
256 inseticida), demonstrado pelo teste de Tukey: *P. emerina* (acetamiprido: F= 0,04, P= 0,99,  
257 GL= 7; malationa: F= 0,18, P= 0,99, GL= 8; fosmete: F= 1,52, P= 0,18, GL= 8; espinosade:  
258 F= 0,44, P= 0,89, GL= 8); *T. fiebrigi* (acetamiprido: F= 0,13, P= 0,99, df= 7; malationa: F=  
259 0,32, P= 0,94, df= 7; fosmete: F= 0,97, P= 0,46, df= 6; espinosade: F= 0,09, P= 0,99, df= 7).

260 Os valores de DL<sub>50</sub> para acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade, após a  
261 exposição tópica, foram significativamente diferentes entre *P. emerina* e *T. fiebrigi* (Tabela  
262 3). Os valores de DL<sub>50</sub> variaram de 1,90 a 6216,55 ng i.a./abelha para *P. emerina* e de 29,29 a  
263 1421,23 ng i.a./abelha para *T. fiebrigi*. A ordem de toxicidade para *P. emerina* (em ordem  
264 decrescente) foi espinosade > malationa > fosmete > acetamiprido; para *T. fiebrigi* a ordem de  
265 toxicidade foi malationa  $\geq$  espinosade > fosmete > acetamiprido (valores de DL<sub>50</sub> mediante  
266 sobreposições nos intervalos de confiança de 95% foram classificados como tendo o mesmo  
267 nível de toxicidade) (Tabela 3).

268 A sobrevivência média das operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi*, quando expostas aos  
269 inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade exibiu diferenças significativas  
270 entre os inseticidas quando expostos via oral (Log-Rank= 320,84; GL= 4; P <0,001); (Log-  
271 Rank= 217,67; GL= 4; P <0,001) e tópica (Log-Rank= 274,88; GL= 4; P <0,001); (Log-  
272 Rank= 246,10; GL= 4; P= <0,001), respectivamente.

273 Quando exposto via oral para *P. emerina* o inseticida fosmete levou a uma rápida  
274 mortalidade (tempo letal mediano ( $LT_{50} [\pm EP] = 7,20 \pm 1,64$  h) e não diferiu do inseticida  
275 malationa ( $LT_{50} [\pm EP] = 11,81 \pm 2,08$  h). O inseticida acetamiprido não reduziu a  
276 sobrevivência das abelhas e não foi significativamente diferente do controle, onde foi ofertado  
277 apenas solução sacarose/água (v/v 50%) (Figura 1A).

278 Os inseticidas fosmete e malationa também proporcionaram rápida mortalidade às  
279 operárias de *T. fiebrigi* ( $LT_{50} [\pm EP] = 7,20 \pm 1,58$  h) e ( $LT_{50} [\pm EP] = 8,55 \pm 1,65$  h), não  
280 diferiram significativamente entre si, entretanto estes inseticidas do grupo Organofosforado  
281 causaram uma redução na sobrevivência das abelhas significativa quando comparados com os  
282 inseticidas espinosade ( $LT_{50} [\pm EP] = 13,34 \pm 1,89$  h) e acetamiprido ( $LT_{50} [\pm EP] = 28,88 \pm$   
283  $2,66$  h). Todos os tratamentos com inseticidas diferiram do grupo controle, que não  
284 apresentou redução na sobrevivência durante o período do teste (Figura 1B).

285 Após a exposição via tópica do inseticida malationa, as operárias de *P. emerina*  
286 apresentaram sobrevivência média ( $\pm EP$ ) de 4,87 ( $\pm 0,71$ ) horas, diferindo dos demais  
287 tratamentos. Os inseticidas espinosade e fosmete reduziram a sobrevivência das abelhas ( $LT_{50}$   
288 [ $\pm EP$ ] = 11,17  $\pm$  1,18 h) e ( $LT_{50} [\pm EP] = 9,86 \pm 1,18$  h) diferindo significativamente de  
289 acetamiprido ( $LT_{50} [\pm EP] = 42,21 \pm 1,91$  h). Todos os tratamentos com inseticidas diferiram  
290 do grupo controle, onde apenas água/acetona (v/v, 50%) foi aplicada, que não apresentou  
291 redução na sobrevivência durante o período do teste (Figura 2A).

292 Os inseticidas malationa e fosmete, expostos via tópica, proporcionaram rápida  
293 mortalidade às operárias de *T. fiebrigi* ( $LT_{50} [\pm EP] = 4,87 \pm 0,71$  h) e ( $LT_{50} [\pm EP] = 4,76 \pm$   
294  $0,89$  h), respectivamente e não diferiram significativamente. As abelhas apresentaram  
295 sobrevivência média ( $\pm EP$ ) de 19,05 ( $\pm 1,76$ ) após a exposição ao inseticida espinosade e  
296 42,21 ( $\pm 1,91$ ) horas, após a exposição ao acetamiprido, este apresentou menor redução na  
297 sobrevivência quando comparado aos demais tratamentos. Todos os tratamentos com

298 inseticidas diferiram do grupo controle, que não apresentou redução na sobrevivência durante  
299 o período do teste (Figura 2B).

300

### 301 *Discussão*

302

303 De acordo com os resultados obtidos nos testes de toxicidade oral aguda, foi  
304 observado que as concentrações recomendadas para os inseticidas malationa, fosmete e  
305 espinosade, para uso em pomares de citros, maçã e pêsego no Brasil, são consideravelmente  
306 mais elevadas do que os valores de CL<sub>50</sub> determinados neste estudo. A concentração  
307 recomendada dos inseticidas malationa (Malathion<sup>®</sup> 1000 EC), fosmete (Imidan<sup>®</sup>) e  
308 espinosade (Tracer<sup>®</sup>) são 53,33 a 106,66, 2,56 a 10,27 e 12,09 a 14,51 vezes o valor da CL<sub>50</sub>  
309 para *P. emerina*; 119,18 a 238,37, 4,0 a 18,53 e 10,61 a 12,74 vezes o valor da CL<sub>50</sub> para *T.*  
310 *fiebrigi*, respectivamente. Acetamiprido (Mospilan<sup>®</sup>), porém, é 52,55 vezes menor que a CL<sub>50</sub>  
311 para *P. emerina* e 123,01 vezes menor que a CL<sub>50</sub> para *T. fiebrigi*.

312 Conforme os valores de DL<sub>50</sub> obtidos através dos testes de exposição tópica para  
313 ambas as espécies, os inseticidas malationa, fosmete e espinosade foram classificados como  
314 altamente tóxicos para as abelhas (DL<sub>50</sub> < 10000 ng i.a./abelha). Entretanto, acetamiprido foi  
315 classificado como moderadamente tóxico (DL<sub>50</sub> 1000 - 10000 ng i.a./abelha) (adaptado de  
316 Felton et al. 1986).

317 O uso de inseticidas é uma ferramenta bastante utilizada no controle de pragas sendo  
318 crucial para a produção de alimentos (Aktar et al. 2009; Schreinemachers e Tipraqsa 2012;  
319 Guedes et al. 2016). Os inseticidas testados no presente trabalho: acetamiprido, malationa,  
320 fosmete e espinosade são moléculas de inseticidas utilizadas em formulações para o controle  
321 das principais pragas da fruticultura, como tefritídeos, tortricídeos e hemípteros. Esses  
322 inseticidas são comumente utilizados via aplicação aérea, com pulverização em área total, ou

323 em volume menor com aplicações direcionadas, através de iscas-tóxicas ou plantas-iscas  
324 (Brasil 2018; PIC 2018; PIM 2018).

325 Os inseticidas do grupo químico Organofosforado, malationa e fosmete, são exemplos  
326 conhecidos de compostos que estão entre os inseticidas mais amplamente utilizados na  
327 agricultura e são letais para as abelhas melíferas e nativas (McBride 2011; Stanley et al. 2015;  
328 Dorneles et al. 2017). Estudos conduzidos por Stevenson (1978) e Rinkevich et al. (2015)  
329 demonstraram que malationa é altamente tóxico para *A. mellifera* com valores de  $DL_{50}$  de  
330 1,10 ng i.a./mg de abelha e 0,27  $\mu$ g i.a./abelha, respectivamente. Da mesma forma, a  $DL_{50}$   
331 tópica calculada para *A. mellifera* para fosmete é de 1.13  $\mu$ g/abelha (Sylvia 2010).

332 A alta mortalidade aguda alcançada por inseticidas em abelhas sem ferrão é uma  
333 consequência da interação do inseticida com seu sítio primário de ação nestas espécies após a  
334 exposição a doses letais. Os Organofosforados, por exemplo, são compostos neurotóxicos que  
335 inibem a acetilcolinesterase (AChE), a qual é responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh)  
336 nas regiões sinápticas das terminações nervosas colinérgicas. A inibição da AChE resulta em  
337 acúmulo de ACh e estimulação excessiva dos receptores colinérgicos (Fukuto 1990; Casida e  
338 Durkin 2013).

339 O espinosade é um bioinseticida feito a partir da mistura das moléculas macrólidas,  
340 espinosina A e espinosina D, produzidas pela bactéria actinomiceta *S. spinosa* Mertz e Yao  
341 (Sparks et al. 2001). Apesar de ter sido considerado seguro para vários artrópodes não alvo  
342 (Sarfraz et al. 2005), o espinosade foi mais tóxico que malationa, fosmete e acetamiprido para  
343 *P. emerina* e *T. fiebrigi*, via oral. Quando foi aplicado via tópica, permaneceu sendo o mais  
344 tóxico para *P. emerina* e se igualou a malationa para *T. fiebrigi*.

345 Em testes de exposição aguda via contato e oral para *A. mellifera*, espinosade foi  
346 classificado como altamente tóxico para as forrageiras, com valores de  $LC_{50}$  de 0,058  $\mu$ g  
347 i.a./abelha e 0,053  $\mu$ g i.a./abelha, respectivamente (Miles 2003). Espinosade também foi

348 considerado altamente tóxico para operárias de *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (DL<sub>50</sub>  
349 12,07 ng i.a./abelha), apresentando um efeito letal maior do que o inseticida imidacloprido  
350 (Tomé et al. 2015). Resultado similar foi observado com o espinetoram (também pertencente  
351 às Espinosinas) que se mostrou altamente tóxico para *T. fiebrigi* e *M. quadrifasciata*  
352 (Piovesan 2018).

353 Esses resultados demonstram que os baixos efeitos adversos do grupo químico das  
354 Espinosinas sobre insetos não alvo podem ser superestimados. Este fato pode estar  
355 relacionado à ação neurotóxica desses inseticidas (Jeschke et al. 2011). O espinosade causa  
356 mortalidade de abelhas sem ferrão através de moduladores alostéricos de receptores  
357 nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) não dessensibilizantes em suas sinapses colinérgicas  
358 (Kirst 2010).

359 Acetamiprido foi o inseticida que apresentou a menor toxicidade para as operárias  
360 adultas de *P. emerina* e *T. fiebrigi*, nos bioensaios via oral e tópica. Acetamiprido também  
361 apresentou baixa toxicidade para *Apis cerana japônica* (Radoszkowski) com valores de DL<sub>50</sub>  
362 0,278 µg i.a./abelha (Yasuda et al. 2017) e para *A. mellifera* (DL<sub>50</sub> 8.09 µg i.a./abelha)  
363 (Decourtye e Devillers 2010). Os Neonicotinoides atuam como agonistas dos nAChR  
364 enquanto mimetizam a atividade do neurotransmissor excitatório ACh (Casida e Durkin  
365 2013).

366 Alguns inseticidas, do grupo químico Neonicotinoide, como o acetamiprido e  
367 tiacloprido apresentam toxicidade relativamente baixa para abelhas (Stanley et al. 2015).  
368 Iwasa et al. (2004) relataram que os inseticidas Neonicotinoides contendo grupos nitro  
369 exibiam maior toxicidade em *A. mellifera* do que aqueles que continham substituições de  
370 ciano na composição química da molécula. A menor toxicidade dos Neonicotinoides do grupo  
371 ciano pode ser atribuída à sua rápida biotransformação (Suchail et al. 2004; Brunet et al.  
372 2005), pois podem ser metabolizados em abelhas para produzir compostos de degradação

373 inócuos, enquanto os outros Neonicotinoides produzem metabólitos tóxicos em abelhas  
374 (Iwasa et al. 2004).

375 Os inseticidas testados não apresentaram a mesma velocidade de mortalidade para *P.*  
376 *emerina* e *T. fiebrigi* na mesma dose (1000 ng/ $\mu$ L). Os inseticidas Organofosforados  
377 apresentaram rápida redução na sobrevivência das abelhas, normalmente durante o primeiro  
378 dia de avaliações. Espinosade, apesar de apresentar alta toxicidade, levou mais tempo para  
379 matar 50 % da população testada. Acetamiprido, por sua vez, não reduziu significativamente a  
380 sobrevivência das abelhas e, em geral, levou mais de 31 horas para matar metade da  
381 população. Essa diferença pode ser devido à baixa toxicidade do acetamiprido para as abelhas  
382 sem ferrão testadas no presente trabalho.

383 Ocorreram diferenças na suscetibilidade entre as espécies de abelhas testadas nesse  
384 estudo conforme o inseticida e metodologia de exposição. *T. fiebrigi* foi menos tolerante que  
385 *P. emerina*, via oral, aos inseticidas malationa e fosmete, mas foi menos suscetível ao  
386 inseticida acetamiprido. Por outro lado, *T. fiebrigi* foi mais tolerante que *P. emerina* aos  
387 inseticidas malationa, fosmete e espinosade, na via tópica. Essa diferença nas respostas de  
388 várias espécies de abelhas à exposição a inseticidas foi observada por outros estudos, onde os  
389 resultados indicaram que *A. mellifera* foi mais tolerante aos inseticidas do que as espécies de  
390 abelhas sem ferrão (Desneux et al. 2007; Nocelli et al. 2011; Arena e Sgolastra 2014).

391 A suscetibilidade diferencial observada nos estudos de toxicidade pode ter decorrido  
392 das características específicas de inseticidas e espécies de abelhas. A espessura e composição  
393 química da cutícula, que é determinada geneticamente e varia entre as espécies, pode facilitar  
394 a penetração do inseticida, causando maior toxicidade de acordo com a espécie de abelha  
395 (Blomquist e Bagnères 2010; Leonhardt et al. 2015). Outros fatores, intrínsecos de cada  
396 espécie, que podem alterar o nível de toxicidade são idade, peso corporal e capacidade de  
397 desintoxicação (Hardstone e Scott 2010; Brittain e Potts 2011).

398 O caráter lipofílico do inseticida quando associado à composição lipídica da cutícula  
399 das abelhas também pode ser um fator determinante para a maior toxicidade de espinosade,  
400 via tópica, quando comparado com malationa em *P. emerina*. Compostos lipofílicos  
401 apresentam maior afinidade com a cutícula e, com isso, são facilmente absorvidos, alcançando  
402 seu alvo de ação rapidamente (Milhome et al. 2009; Leite et al. 2012). Essa hipótese se baseia  
403 na baixa solubilidade em água do inseticida espinosade (89,5 mg/L a 20°C) comparada a de  
404 malationa (145 mg/L a 25°C).

405 A diferença de suscetibilidade, via oral, entre as espécies avaliadas pode estar  
406 relacionada à sua capacidade de detoxificação. Quando a via de entrada se dá pela ingestão de  
407 pólen e néctar contaminados, a toxicidade dos produtos pode ser reduzida, devido à ação de  
408 várias enzimas detoxificantes presentes no sistema digestório das abelhas (Yu 2008;  
409 Berenbaum e Johnson 2015). No entanto, apesar de haver a possibilidade de vincular enzimas  
410 específicas ou famílias de enzimas a processos de desintoxicação de abelhas, os mecanismos  
411 gerais de proteção que permitem a insetos de espécies diferentes apresentarem tolerância a  
412 variedade de inseticidas potencialmente tóxicos encontrados em néctares e pólen permanecem  
413 desconhecidos (Rand et al. 2015).

414 Para avaliar a resposta de toxicidade aguda dos inseticidas foram utilizadas as  
415 formulações comerciais em duas vias de exposição: oral e tópica. A utilização dessas duas  
416 vias de exposição justifica-se pelo fato de que as abelhas podem entrar em contato com estes  
417 produtos no momento do forrageamento em áreas tratadas (Fletcher e Barnett et al. 2003). A  
418 absorção dos inseticidas pode ocorrer através da ingestão de pólen e néctar com resíduos de  
419 inseticidas (Johnson et al. 2010; Mullin et al. 2010; Dively e Kamel 2012) ou por via tópica,  
420 quando produtos químicos suspensos no ar entram em contato com o corpo da abelha (Wolff  
421 et al. 2008).

422 Além disso, ao contrário de *A. mellifera*, as abelhas nativas não podem ser  
423 temporariamente deslocadas durante a pulverização de inseticidas, pois os ninhos dessas  
424 espécies encontram-se nos troncos das árvores nativas presentes nas bordas dos pomares, ou  
425 dentro do perímetro destes. Especialização floral, período de nidificação mais curto e faixa de  
426 forrageamento limitada são outros fatores que podem tornar as abelhas sem ferrão mais  
427 suscetíveis a inseticidas em comparação com as abelhas melíferas (Thompson e Hunt 1999;  
428 Brittain e Potts 2011).

429 A escolha entre utilizar formulação comercial ou ingrediente ativo de qualidade  
430 técnica (99,9% pureza) pode alterar substancialmente a classificação de toxicidade de muitos  
431 inseticidas, devido à toxicidade do próprio produto químico, concentração dos inseticidas  
432 formulados e potencial interação entre o ingrediente ativo e formulação dos materiais.  
433 Entretanto, inseticidas formulados são a única opção para os agricultores protegerem suas  
434 plantações quando o controle químico torna-se necessário. Por isso, a importância de medir a  
435 toxicidade dos inseticidas formulados, pois inclui a toxicidade total do próprio inseticida, dos  
436 agentes de formulação e potenciais interações aditivas e sinérgicas (Zhu et al. 2015).

437 Os dados obtidos nesse estudo fornecem informações essenciais para orientar a  
438 seleção de produtos químicos no manejo de pragas agrícolas visando minimizar o risco para  
439 as abelhas nativas. A dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) e a concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) são  
440 parâmetros geralmente utilizados para medir a toxicidade de uma substância. Além disso,  
441 nossos resultados confirmam a importância de considerar outras espécies de abelhas nas  
442 avaliações de risco, não apenas usando *A. mellifera* como referência (Decourtye et al. 2013).

443 Apesar da alta toxicidade aguda de espinosade, fosmete e malationa demonstrada no  
444 presente trabalho sobre *P. emerina* e *T. fiebrigi*, testes de letalidade aguda em laboratório  
445 podem ser considerados indicadores simplistas do impacto ambiental, visto que os inseticidas,  
446 principalmente os neonicotinoides, podem apresentar efeitos subletais nas abelhas (Desneux

447 et al. 2007; Carvalho et al. 2009; Laurino et al. 2011; Laycock et al. 2012; Blacquiere et al.  
448 2012; Henry et al. 2012). Assim, mais estudos avaliando efeitos subletais e experimentos de  
449 semi-campo e campo são necessários para investigar os impactos desses produtos em  
450 condições mais reais, visando a preservação da ação dos polinizadores no momento do  
451 controle de pragas.

452

### 453 *Agradecimentos*

454

455 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
456 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores  
457 também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
458 (CNPq) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Centro Nacional de  
459 Pesquisa Uva e Vinho pela concessão de bolsas de estudos e suporte financeiro.

460

### 461 *Referências*

462

463 Aktar W, Sengupta D, Chowdhury, A (2009) Impact of pesticides use in agriculture: their  
464 benefits and hazards. *Interdiscip Toxicol* 2:1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>

465 Al Naggar Y, Codling G, Vogt A, Naiem E, Mona M, Seif A, Giesy JP (2015)

466 Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their  
467 potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicol Environ Saf* 114:1-8.

468 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.039>

469 Arena M, Sgolastra F (2014) A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides.

470 *Ecotoxicology* 23:324-334. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1190-1>

- 471 Bailey J, Scott-Dupree C, Harris R, Tolman J, Harris B (2005) Contact and oral toxicity to  
472 honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in  
473 Ontario, Canada. *Apidologie* 36:623-633. <https://doi.org/10.1051/apido:2005048>
- 474 Becher MA, Osborne JL, Thorbek P, Kennedy PJ, Grimm V (2013) Towards a systems  
475 approach for understanding honeybee decline: a stock taking and synthesis of existing  
476 models. *J Appl Ecol* 50:868-880. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12112>
- 477 Berenbaum MR, Johnson RM (2015) Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Curr*  
478 *Opin Insect Sci* 10:51-58. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.03.005>
- 479 Blacquiere T, Smaghe G, Van Gestel CA, Mommaerts V (2012) Neonicotinoids in bees: a  
480 review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology* 21:973-992. .  
481 <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>
- 482 Blomquist GJ, Bagnères AG (2010) Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and  
483 chemical ecology. Cambridge University Press, New York
- 484 Brasil (2018) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit.  
485 [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons).
- 486 Brittain C, Potts SG (2011) The potential impacts of insecticides on the life-history traits of  
487 bees and the consequences for pollination. *Basic Appl Ecol* 12: 321–331.  
488 <https://doi.org/10.1016/j.baae.2010.12.004>
- 489 Brunet JL, Badiou A, Belzunces LP (2005) In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six  
490 biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest Manag Sci* 61:742-748.  
491 <https://doi.org/10.1002/ps.1046>
- 492 Carvalho SM, Carvalho GA, Carvalho CF, Bueno Filho JSS, Baptista APM (2009)  
493 Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada  
494 *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Arq Inst Biol* 76:597-606

- 495 Casida JE, Durkin KA (2013) Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and  
496 secondary effects. *Annu Rev Entomol* 58:99-117. [https://doi.org/10.1146/annurev-ento-](https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645)  
497 120811-153645
- 498 Cortopassi-Laurino M, Imperatriz-Fonseca VL, Roubik DW, Dollin A, Heard T, Aguilar I,  
499 Venturieri GC, Eardley C, Nogueira-Neto P (2006) Global meliponiculture: challenges and  
500 opportunities. *Apidologie* 37:275-292. <https://doi.org/10.1051/apido:2006027>
- 501 Decourtye A, Devillers J (2010) Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: Thany  
502 SH (eds) *Insect nicotinic acetylcholine receptors*. *Adv Exp Med Biol* 85-95.  
503 [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_8)
- 504 Decourtye A, Henry M, Desneux N (2013) Environment: overhaul pesticide testing on bees.  
505 *Nature* 497:188. <https://doi.org/10.1038/497188a>
- 506 Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on  
507 beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* 52:81-106.  
508 <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- 509 Dively GP, Kamel A (2012) Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and  
510 their potential exposure to pollinators. *J Agric Food Chem* 60:4449-4456.  
511 <https://doi.org/10.1021/jf205393x>
- 512 Dorneles AL, de Souza Rosa A, Blochtein B (2017) Toxicity of organophosphorus pesticides  
513 to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigi*. *Apidologie* 48:612-  
514 620. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0502-x>
- 515 Felton JC, Oomen PA, Stevenson JH (1986) Toxicity and Hazard of pesticides to honeybees:  
516 harmonization of the test methods. *Bee World* 67:114-124.  
517 <https://doi.org/10.1080/0005772X.1986.11098883>
- 518 Fletcher M, Barnett L (2003) Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. *Bull*  
519 *Insectology* 56:141-145

- 520 Fukuto TR (1990) Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.  
521 Environ Health Perspect 87:245-254. <https://doi.org/10.1289/ehp.9087245>
- 522 Garratt MP, Breeze TD, Jenner N, Polce C, Biesmeijer JC, Potts SG (2014) Avoiding a bad  
523 apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. Agric Ecosyst Environ  
524 184:34-40. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.10.032>
- 525 Giannini TC, Cordeiro GD, Freitas BM, Saraiva AM, Imperatriz-Fonseca VL (2015a) The  
526 dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. J Econ  
527 Entomol 108:849-857. <https://doi.org/10.1093/jee/tov093>
- 528 Giannini TC, Boff S, Cordeiro GD, Cartolano EA, Veiga AK, Imperatriz-Fonseca VL,  
529 Saraiva AM (2015b) Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. Apidologie  
530 46:209-223. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0316-z>
- 531 Godfray HCJ, Blacquiere T, Field LM, Hails RS, Petrokofsky G, Potts SG, Raine NE,  
532 Vanbergen AJ, McLean AR (2014) A restatement of the natural science evidence base  
533 concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. Proc R Soc B 281:20140558.  
534 <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0558>
- 535 Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL (2015) Bee declines driven by combined stress  
536 from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347:1255957.  
537 <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- 538 Guedes RNC, Smagghe G, Stark JD, Desneux N (2016) Pesticide-induced stress in arthropod  
539 pests for optimized integrated pest management programs. Annu Rev Entomol 61:43-62.  
540 <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023646>
- 541 Hardstone MC, Scott JG (2010) Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other  
542 insects? Pest Manag Sci 66:1171-1180. <https://doi.org/10.1002/ps.2001>

- 543 Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O (2012) A common pesticide decreases foraging  
544 success and survival in honey bees. *Science* 336:348-350.  
545 <https://doi.org/10.1126/science.1215039>
- 546 Imperatriz-Fonseca VL, Saraiva AM, De Jong D (2006) Bees as pollinators in Brazil. In  
547 Workshop on São Paulo Declaration on Pollinators plus 5 Forum. Holos Editora, São Paulo
- 548 Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM (2004) Mechanism for the differential toxicity  
549 of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Prot* 23:371-378.  
550 <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.08.018>
- 551 Jeschke P, Nauen R, Sparks TC, Loso MR, Watson GB, Babcock JM, Kramer JV, Zhu Y,  
552 Nugent BM, Thomas JD, Crouse GD, Dripps JE, Waldron C, Salgado VL, Schnatterer S,  
553 Holmes KA, Pitterna T (2011) Nervous System. *Modern crop protection compounds* 1127-  
554 1326.
- 555 Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M (2010) Pesticides and honey bee toxicity –  
556 USA. *Apidologie* 41:312-331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
- 557 Klatt BK, Burmeister C, Westphal C, Tschardt T, von Fragstein M (2013) Flower volatiles,  
558 crop varieties and bee responses. *PLoS One* 8:e72724.  
559 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072724>
- 560 Kirst HA (2010) The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural  
561 products research. *J Antibiot* 63:101. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.5>
- 562 Laurino D, Porporato M, Patetta A, Manino A (2011) Toxicity of neonicotinoid insecticides  
563 to honey bees: laboratory tests *Bull Insectol* 64:107-13
- 564 Laycock I, Lenthall KM, Barratt AT, Cresswell JE (2012) Effects of imidacloprid, a  
565 neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*)  
566 *Ecotoxicology* 21:1937-1945. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-012-0974-4>.

- 567 Leite GLD, Picanco M, Guedes RNC, Gusmão MR (2012) Selectivity of insecticides with and  
568 without mineral oil to *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae), a predator of *Tuta*  
569 *absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) *Ceiba* 39:191-194
- 570 Leonhardt SD, Wallace HM, Blüthgen N, Wenzel F (2015) Potential role of environmentally  
571 derived cuticular compounds in stingless bees. *Chemoecology* 25:159-167.  
572 <https://doi.org/10.1007/s00049-015-0185-6>
- 573 Magalhães TL, Venturieri GC (2010) Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas  
574 sem ferrão (Apidae: Meliponini) no Nordeste paraense. Embrapa Amazônia Oriental, Belém.  
575 <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/883922/1/Doc364.pdf>
- 576 McBride DK (2011) Protecting honeybees from pesticides. North Dakota University, Fargo
- 577 Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, Belzunces LP et al. (2013) Standard methods for  
578 toxicology research in *Apis mellifera*. *J Apic Res* 52:1–60.  
579 <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.14>
- 580 Michener CD (2007) *The Bees of the World*. 2nd edn. Johns Hopkins, Baltimore
- 581 Michener CD (2013) The meliponini. In *Pot-honey* Springer, New York
- 582 Miles M (2003) The effects of spinosad, a naturally derived insect control agent to the  
583 honeybee. *Bull Insectology* 56:119-124
- 584 Milhome MAL, Sousa DOB, Lima FDA, Nascimento RD (2009) Avaliação do potencial de  
585 contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do  
586 Baixo Jaguaribe, CE. *Eng Sanit Ambient* 14:363-372
- 587 Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, et al. (2010)  
588 High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications for  
589 honey bee health. *PLoS One* 5: e9754. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>

590 Nicholls CI, Altieri MA (2013) Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators  
591 in agroecosystems: A review. *Agron Sustain Dev*, 33:257-274.  
592 <https://doi.org/10.1007/s13593-012-0092-y>

593 Nocelli RCF, Malaspina O, Carvalho SM, Lourenço CT, Roat TC, Pereira AM, Silva-Zacarin  
594 ECM (2011) As abelhas e os defensivos agrícolas In: Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL,  
595 Saraiva AM Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso  
596 sustentável, conservação e serviços ambientais. EDUSP, São Paulo

597 Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by  
598 animals? *Oikos* 120:321-326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>

599 OECD (1998a) Organization for Economic Co-operation and Development. Guidelines for  
600 the testing of chemicals: Honeybees, acute oral toxicity test. Environmental health safety  
601 division, organisation for economic co-operation and development Number 213, Paris, France

602 OECD (1998b) Organization for Economic Co-Operation and Development. Guidelines for  
603 the testing of chemicals: Honeybees, acute contact toxicity test. Environmental health safety  
604 division, organisation for economic co-operation and development Number 214, Paris, France

605 Orth AI (1984) Levantamento das abelhas nativas (Hym., Apoidea) associadas às flores da  
606 macieira (*Pyrus malus* L.). *Anais V Cong Bras Ap* 280-287

607 Ortolan SMLS, Laroça S (1996) Melissocenótica em áreas de cultivo de macieira (*Pyrus*  
608 *malus* L.) em Lages (Santa Catarina), com notas comparativas e experimento de polinização  
609 com *Plebeia emerina* (Fries) (Hymenoptera, Apoidea). *Acta Biol Parana* 25:1-113

610 PIC (2018) Lista PIC – Produção Integrada de Citrus. Grade de inseticidas, acaricidas,  
611 fungicidas da produção integrada de citrus – PIC BRASIL. Disponível em  
612 [https://www.fundecitrus.com.br/pdf/Grade\\_de\\_Agrotoxicos\\_03.12.18\\_PT.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/Grade_de_Agrotoxicos_03.12.18_PT.pdf). Acesso em 28  
613 nov 2018

- 614 PIM (2018) Produção Integrada de Maçã – PIM. Grade de agrotóxicos e agroquímicos ciclo  
615 2018/2019. Disponível em [http://agapomi.com.br/wp-content/uploads/Grade-de-](http://agapomi.com.br/wp-content/uploads/Grade-de-Agroqu%C3%ADmicos-ciclo-2018-19-1.pdf)  
616 [Agroqu% C3% ADmicos-ciclo-2018-19-1.pdf](http://agapomi.com.br/wp-content/uploads/Grade-de-Agroqu%C3%ADmicos-ciclo-2018-19-1.pdf). Acesso em 28 nov 2018
- 617 Pires CSS, Pereira FDM, Lopes MTDR, Nocelli RCF, Malaspina O, Pettis JS, Teixeira ÉW  
618 (2016) Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: are there cases of CCD? Pesquisa  
619 Agropecuária Brasileira, 51:422-442. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>
- 620 Piovesan B (2018) Inventário de visitantes florais na cultura do morangueiro e efeitos de  
621 inseticidas sobre as abelhas nativas *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca fiebrigi*.  
622 Dissertation, Federal University of Pelotas
- 623 Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE (2010) Global  
624 pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol Evol 25:345-353.  
625 <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>
- 626 R Development Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing.  
627 R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL  
628 <http://www.R-project.org/>.
- 629 Rinkevich FD, Margotta JW, Pittman JM, Danka RG et al. (2015) Genetics, synergists, and  
630 age affect insecticide sensitivity of the honey bee, *Apis mellifera*. PLoS One 10:e0139841.  
631 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139841>
- 632 Ritz C, Streibig JC (2005) Bioassay Analysis using R. J Stat Softw 12:1-22.  
633 <http://hdl.handle.net/10.18637/jss.v012.i05>
- 634 Sanchez-Bayo F, Goka K (2014) Pesticide residues and bees—a risk assessment. PloS One  
635 9:e94482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>
- 636 Sarfraz M, Dossall LM, Keddie BA (2005) Spinosad: a promising tool for integrated pest  
637 management. Outlooks P Manag 16:78-84. <https://doi.org/10.1564/16apl09>

- 638 Schreinemachers P, Tipraqsa P (2012) Agricultural pesticides and land use intensification in  
639 high, middle and low income countries. *Food Policy* 37:616-626.  
640 <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2012.06.003>
- 641 Slaa EJ, Chaves LAS, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE (2006) Stingless bees in applied  
642 pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37:293-315.  
643 <https://doi.org/10.1051/apido:2006022>
- 644 Sparks TC, Crouse GD, Durst G (2001) Natural products as insecticides: the biology,  
645 biochemistry and quantitative structure–activity relationships of spinosyns and spinosoids.  
646 *Pest Manag Sci* 57:896-905. <https://doi.org/10.1002/ps.358>
- 647 Stanley J, Sah K, Jain SK, Bhatt JC, Sushil SN (2015) Evaluation of pesticide toxicity at their  
648 field recommended doses to honeybees, *Apis cerana* and *A. mellifera* through laboratory,  
649 semi-field and field studies. *Chemosphere* 119:668-674.  
650 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.039>
- 651 Stevenson JH (1978) The acute toxicity of unformulated pesticides to worker honey bees  
652 (*Apis mellifera* L.) *Plant Pathol* 27:38-40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1978.tb01070.x>
- 653 Stoner KA, Eitzer BD (2013) Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected  
654 in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. *PLoS One* 8:e77550.  
655 <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1978.tb01070.x>
- 656 Suchail S, De Sousa G, Rahmani R, Belzunces LP (2004) In vivo distribution and  
657 metabolism of <sup>14</sup>C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest Manag*  
658 *Sci* 60:1056-1062. <https://doi.org/10.1002/ps.895>
- 659 Sylvia M (2010) Pesticide Safety 2010- Insecticides update, bee toxicity and management  
660 decisions. [http://scholarworks.umass.edu/cranberry\\_extension](http://scholarworks.umass.edu/cranberry_extension)
- 661 Thompson HM, Hunt LV (1999) Extrapolating from honeybees to bumblebees in pesticide  
662 risk assessment. *Ecotoxicology* 8:147-166. <https://doi.org/10.1023/A:1026444029579>

- 663 Thompson GD, Dutton R, Sparks TC (2000) Spinosad—a case study: an example from a  
664 natural products discovery programme. *Pest Manag Sci* 56:696-702.  
665 [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:8<696::AID-PS182>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:8<696::AID-PS182>3.0.CO;2-5)
- 666 Tomé HVV, Barbosa WF, Martins GF, Guedes RNC (2015) Spinosad in the native stingless  
667 bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere*  
668 124:103-109. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.038>
- 669 Urbaneja A, Chueca P, Montón H, Pascual-Ruiz S et al. (2009) Chemical alternatives to  
670 malathion for controlling *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and their side effects on  
671 natural enemies in Spanish citrus orchards. *J Econ Entomol* 102:144-151.  
672 <https://doi.org/10.1603/029.102.0121>
- 673 Venturieri GC, Alves DA, Villas-Bôas JK, Carvalho CA et al. (2011) Meliponicultura no  
674 Brasil: Situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização, In: Imperatriz-Fonseca  
675 VL, Canhos DAL, Saraiva AM, Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a  
676 biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. EDUSP, São Paulo
- 677 Witter S, Nunes-Silva P, Blochtein B, Lisboa BB, Imperatriz-Fonseca VL (2014) As abelhas  
678 e a agricultura. EDIPUCRS, Porto Alegre
- 679 Wiest L, Buleté A, Giroud B, Fratta F. et al. (2011) Multi-residue analysis of 80  
680 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure  
681 followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *J*  
682 *Chromatogr A* 1218:5743-5756. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.079>
- 683 Wolff LF, Dos Reis VDA, Santos RSS (2008) Abelhas melíferas: bioindicadores e qualidade  
684 ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica. Embrapa Clima  
685 Temperado, Pelotas

686 Yasuda M, Sakamoto Y, Goka K, Nagamitsu, T, Taki H (2017) Insecticide susceptibility in  
687 Asian honey bees (*Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae)) and implications for wild honey bees  
688 in Asia. J Econ Entomol 110:447-452. <https://doi.org/10.1093/jee/tox032>  
689 Yu SJ (2008) The Toxicology and Biochemistry of Insecticides. CRC Press, Boca Raton  
690 Zhu YC, Adamczyk J, Rinderer T, Yao J, Danka R, Luttrell R, Gore J (2015) Spray toxicity  
691 and risk potential of 42 commonly used formulations of row crop pesticides to adult honey  
692 bees (Hymenoptera: Apidae) J Econ Entomol 108:2640-2647.  
693 <https://doi.org/10.1093/jee/tov269>

694 Tabela 1 Inseticidas utilizados nos bioensaios de toxicidade letal sobre *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Concentração [Formulação] <sup>a</sup>	Cultura	Praga-alvo	Dose registrada <sup>b</sup>			Grupo químico	
					p. c. 100L <sup>-1</sup>	g i.a. 100L <sup>-1</sup>	ng i.a. μL <sup>-1</sup>		
Acetamiprido <sup>1</sup>	Mospilan <sup>®</sup>	200 [SP]	Maçã	<i>Anastrepha fraterculus</i>	40	8	80	Neonicotinoide	
				<i>Grapholita molesta</i>	40	8	80		
Malationa <sup>2</sup>	Malathion <sup>®</sup> 1000 EC	1000 [EC]	Citros	<i>Heliothrips haemorrhoidalis</i>	150	150	1500	Organofosforado	
				<i>Ecdytoplopha aurantiana</i>	150	150	1500		
				<i>Aethalion reticulatum</i>	150	150	1500		
				<i>Diaphorina citri</i>	150	150	1500		
				<i>Ceratitidis capitata</i>	200	200	2000		
				<i>Quadraspidotus perniciosus</i>	100	100	1000		
			Maçã	<i>Sternocolaspis quatuordecimcostata</i>	100	100	1000		
				<i>Eriosoma lanigerum</i>	100	100	1000		
				<i>Anastrepha obliqua</i>	200	200	2000		
				Pêssego	<i>Anuraphis shwartzi</i>	100	100		1000
					<i>Ceratitidis capitata</i>	200	200		2000
					<i>Grapholita molesta</i>	150	150		1500

Fosmete <sup>3</sup>	Imidan <sup>®</sup> 500 WP	500 [WP]	Citros	<i>Anastrepha fraterculus</i>	150	75	750	Organofosforado
				<i>Ceratitis capitata</i>	150	75	750	
				<i>Diaphorina citri</i>	50	25	250	
			Maçã	<i>Ecdyolopha aurantiana</i>	150	75	750	
				<i>Anastrepha fraterculus</i>	200	100	1000	
				<i>Grapholita molesta</i>	200	100	1000	
Pêssego	<i>Anastrepha fraterculus</i>	200	100	1000				
Espinosa <sup>4</sup>	Tracer <sup>®</sup>	480 [SC]	Citros	<i>Phyllocnistis citrella</i>	15,0	7,2	72	Espinosa
				<i>Ecdyolopha aurantiana</i>	12,5	6	60	

695 <sup>1</sup>Iharabras SA Indústrias Químicas; <sup>2</sup>FMC Química do Brasil Ltda.; <sup>3</sup>Cross Link Consultoria e Comércio Ltda.; <sup>4</sup>Dow AgroSciences Industrial  
696 Ltda. <sup>a</sup>Concentração e [formulação] (g de i.a. kg ou L<sup>-1</sup>) - EC: emulsão concentrada; SC: suspensão concentrada; SP: pó solúvel; WP: pó  
697 molhável; <sup>b</sup>Dose do inseticida registrado no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) para cultura e praga-alvo (Brasil 2018) - p.c.=  
698 dose do produto comercial (g ou mL.100L de água<sup>-1</sup>), g i.a.= gramas de ingrediente ativo.100L de água<sup>-1</sup>, ng i.a.= nanogramas de ingrediente  
699 ativo.µL<sup>-1</sup> de água.

700 Tabela 2 Concentração letal média (CL<sub>50</sub> ng i.a./μL de dieta) de acetamiprido, fosmete,  
 701 malationa e espinosade, expostos via oral às operárias de *Plebeia emerina* e *Tetragonisca*  
 702 *fiebrigi*.

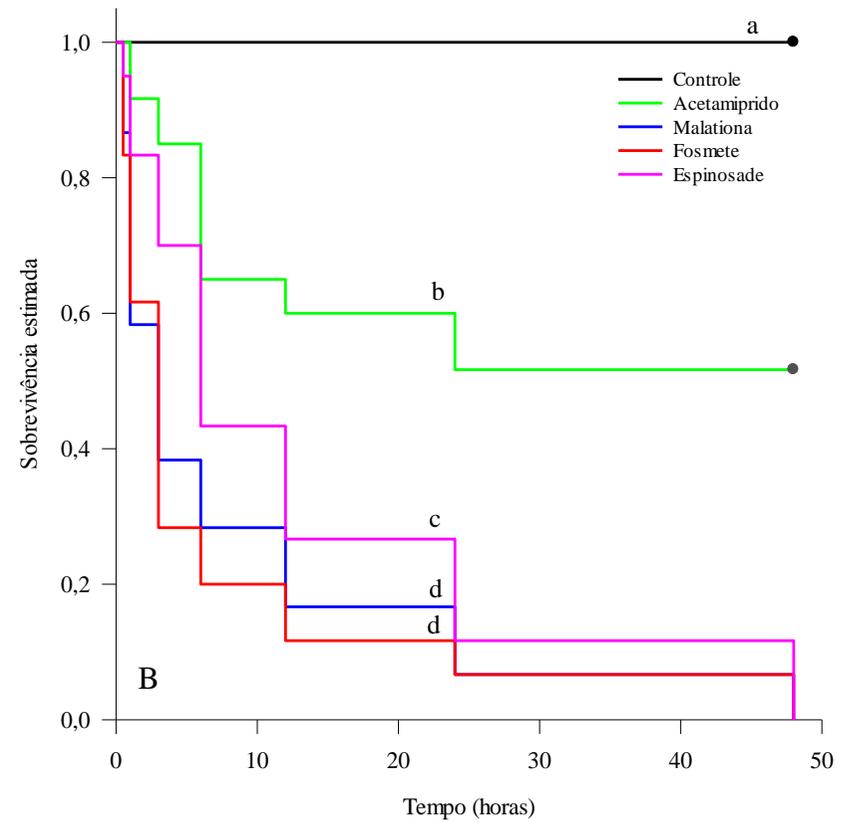
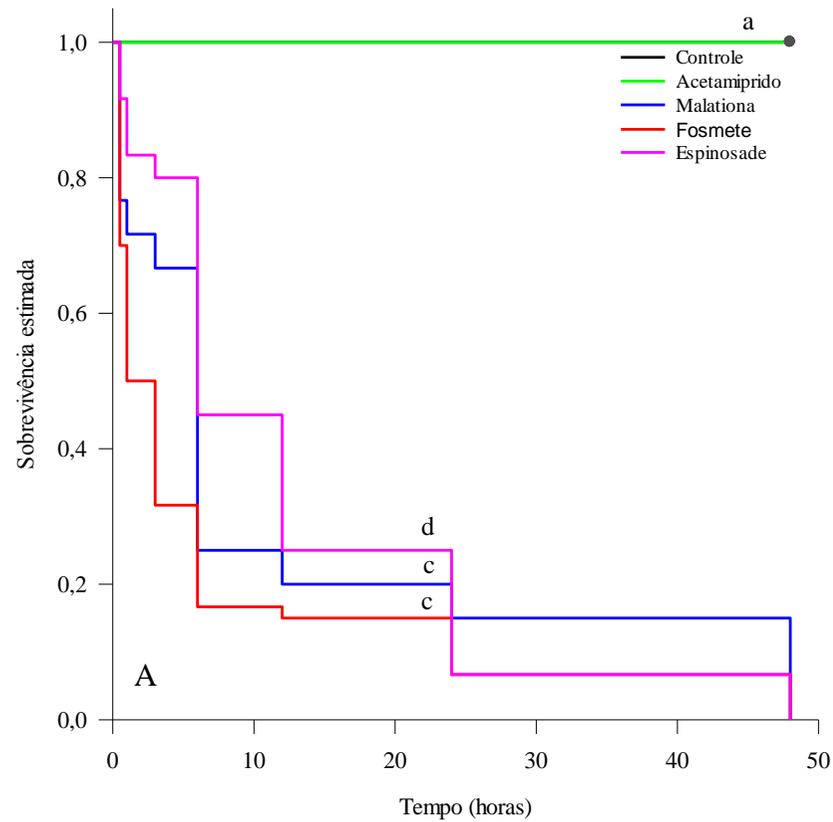
Inseticida	Espécie <sup>1</sup>	n	Coefficiente angular±EP	CL <sub>50</sub> * <sup>2</sup> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	P
Acetamiprido	<i>P.e.</i>	480	2,13±0,20	4204,06 (3752,51-4655,60)	18,7	<0,0001
	<i>T.f.</i>	480	0,97±0,12	9841,32 (5959,94-13722,71)	5,1	<0,0001
Malationa	<i>P.e.</i>	540	1,93±0,24	18,75 (16,36-21,13)	15,7	<0,0001
	<i>T.f.</i>	480	4,96±0,84	8,39 (7,63-9,16)	22,1	<0,0001
Fosmete	<i>P.e.</i>	540	2,78±0,86	97,33 (95,12-99,53)	8,6	<0,0001
	<i>T.f.</i>	420	2,76±0,74	53,91 (42,56-65,25)	9,6	<0,0001
Espinosaide	<i>P.e.</i>	540	2,16±0,35	4,96 (4,16-5,75)	12,5	<0,0001
	<i>T.f.</i>	480	2,31±0,51	5,65 (4,56-6,73)	10,5	<0,0001

703 <sup>1</sup>*P.e.* = *Plebeia emerina*; *T.f.* = *Tetragonisca fiebrigi*; <sup>2</sup>Concentração letal 50: concentração de  
 704 inseticida que causa mortalidade de 50% da população (ng i.a./μL de dieta); \*Valores cujos  
 705 intervalos de confiança (IC 95%) não se sobrepõem são considerados significativamente  
 706 diferentes.

707 *Tabela 3* Dose letal média (DL<sub>50</sub> ng i.a./abelha) de acetamiprido, fosmete, malationa e  
 708 espinosade, expostos via tópica às operárias de *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*.

Inseticida	Espécie <sup>1</sup>	n	Coefficiente angular±EP	DL <sub>50</sub> * <sup>2</sup> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	P
Acetamiprido	<i>P.e.</i>	540	1,09±0,11	6216,55 (4664,52-7768,57)	8,0	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	1,02±0,12	1421,23 (966,95-1875,51)	6,2	<0,0001
Malationa	<i>P.e.</i>	540	1,18±0,19	10,90 (7,96-13,83)	7,3	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	1,72±0,20	29,29 (24,84-33,73)	13,2	<0,0001
Fosmete	<i>P.e.</i>	480	1,59±0,22	19,54 (14,81-24,24)	8,3	<0,0001
	<i>T.f.</i>	480	2,70±0,29	41,95 (37,96-45,95)	21,1	<0,0001
Espinosaide	<i>P.e.</i>	540	1,67±0,24	1,90 (1,58- 2,22)	11,8	<0,0001
	<i>T.f.</i>	480	1,38±0,13	29,79 (24,96-34,63)	12,4	<0,0001

709 <sup>1</sup>*P.e.* = *Plebeia emerina*; *T.f.* = *Tetragonisca fiebrigi*; <sup>2</sup>Dose letal 50: dose de inseticida que  
 710 causa mortalidade de 50% da população (ng i.a./abelha); \*Valores cujos intervalos de  
 711 confiança (IC 95%) não se sobrepõem são considerados significativamente diferentes.

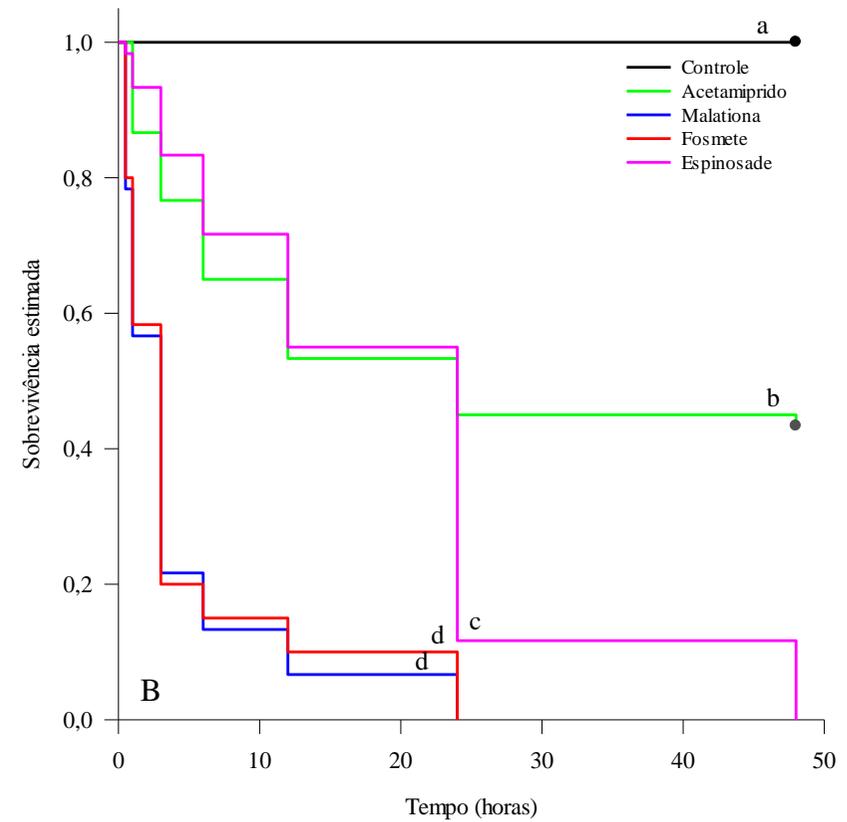
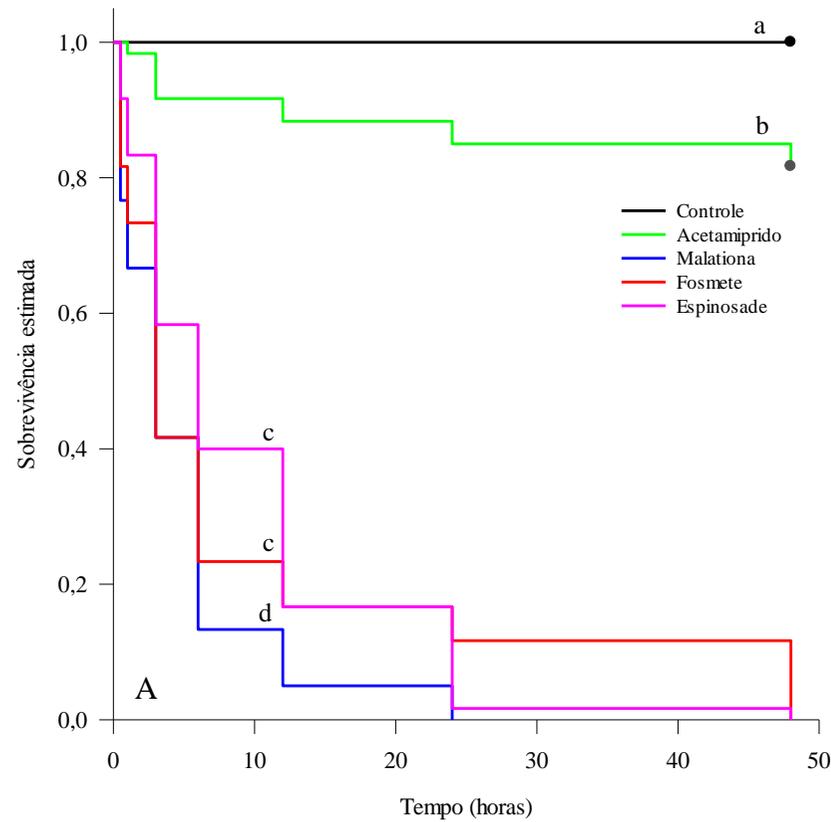


712

713 *Figura 1* Curvas de sobrevivência para *Plebeia emerina* (A) e *Tetragonisca fiebrigi* (B) expostas via oral à acetamiprido, malationa, fosmete e  
 714 espinosade.

715 \*A curva do tempo médio de sobrevivência seguida pela mesma letra minúscula não diferiu significativamente usando o teste de Holm-Sidak ( $P$

716  $<0,05$ ).



717

718 *Figura 2* Curvas de sobrevivência para *Plebeia emerina* (A) e *Tetragonisca fiebrigi* (B) expostas via tópica à acetamiprido, malationa, fosmete e  
 719 espinosade.

720 \* A curva do tempo médio de sobrevivência seguido pela mesma letra minúscula não diferiu significativamente usando o teste de Holm-Sidak ( $P$

721  $<0,05$ ).

### **3. Artigo 2 - Apidologie**

Versão em português

**Efeito subletal de inseticidas sobre o comportamento de abelhas sem ferrão  
*Plebeia emerina* (Friese) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera:  
Apidae: Meliponini)**

Aline Costa Padilha, Anderson Dionei Grützmacher, Bruna Piovesan, Paulo  
Azevedo, Juliano de Bastos Pazini, Marcos Botton, Moisés João Zotti

1 **Efeito subletal de inseticidas sobre o comportamento de abelhas sem ferrão *Plebeia***  
2 ***emerina* (Friese) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)**

3

4 Aline Costa Padilha<sup>1</sup>, Anderson Dionei Grützmacher<sup>1</sup>, Bruna Piovesan<sup>1</sup>, Paulo Azevedo<sup>1</sup>,  
5 Juliano de Bastos Pazini<sup>1</sup>, Marcos Botton<sup>2</sup>, Moises João Zotti<sup>1</sup>

6

7 <sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM),  
8 Departamento de Fitossanidade (DFs)

9 <sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Embrapa Uva e Vinho

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25 **Título curto:** Efeito subletal de inseticidas sobre *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*

26 **Resumo** - *Plebeia emerina* (Friese) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae:  
27 Meliponini), são importantes polinizadoras de plantas nativas e cultivadas no Brasil. Durante o  
28 forrageamento as operárias estão expostas à agentes estressores, principalmente agrotóxicos.  
29 Muitos inseticidas, mesmo em baixas concentrações, podem ser extremamente tóxicos para as  
30 abelhas, induzindo mudanças no comportamento, que afetam toda a colônia. Este trabalho teve  
31 como objetivo conhecer o efeito de doses subletais de acetamiprido, malationa, fosmete e  
32 espinosade na atividade locomotora, de voo e a percepção à sacarose das abelhas sem ferrão *P.*  
33 *emerina* e *T. fiebrigi*. As operárias foram expostas, via oral, à duas concentrações (CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub>)  
34 dos inseticidas e um tratamento controle, composto por xarope de açúcar (50% v/v). Após 4 e  
35 24 horas de exposição, avaliou-se a velocidade média das operárias para percorrer um túnel  
36 transparente de 50 cm, e a capacidade de decolagem em direção a uma fonte de luz. A  
37 sensibilidade à sacarose foi avaliada através do reflexo de extensão da probóscide (REP) não  
38 condicionado. As concentrações subletais CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub> dos inseticidas testados reduziram a  
39 velocidade média das abelhas no túnel, bem como a capacidade de decolagem, quatro horas  
40 após a contaminação. Os inseticidas acetamiprido e espinosade afetaram a atividade locomotora  
41 e de voo, 24 horas após a exposição. Quando oferecida sacarose 50%, as abelhas contaminadas  
42 com as CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub> de acetamiprido e pela CL<sub>50</sub> de malationa apresentaram o menor número  
43 de indivíduos com resposta (REP) positiva em relação as abelhas não contaminadas. Os  
44 inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade, em doses subletais, causam  
45 alterações no comportamento operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi* comprometendo a atividade  
46 locomotora e de voo, de orientação e reconhecimento de alimento, dessas abelhas.

47

48 **Palavras-chave:** toxicidade, abelha nativa, atividade locomotora, voo, reflexo da extensão da  
49 probóscide.

50

## 51 **Introdução**

52           As abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), também conhecidas por  
53 abelhas indígenas ou meliponíneos, são insetos sociais distribuídos, principalmente, nas regiões  
54 Neotropicais (Witter e Nunes-Silva 2014). A tribo Meliponini apresenta alta diversidade de  
55 espécies, tanto do ponto de vista morfológico quanto comportamental; ausência de ferrão  
56 funcional, baixa agressividade e facilidade de manejo e são essenciais para a manutenção da  
57 vegetação brasileira e de diferentes culturas agrícolas (Nogueira-Neto 1997; Venturieri et al.  
58 2011; Freitas e Nunes-Silva 2012; Witter et al. 2014).

59           A meliponicultura, criação racional de meliponíneos, é praticada em várias partes do  
60 mundo e tem como objetivo principal a produção de mel (Cortopassi-Laurino et al. 2006). Essa  
61 atividade surge como alternativa de geração de renda para a agricultura familiar, pois muitas  
62 espécies são relevantes na produção de mel e na melhoria da produção agrícola, através dos  
63 serviços de polinização que podem proporcionar (Cortopassi-Laurino et al. 2006; Slaa et al.  
64 2006; Magalhães and Venturieri 2010).

65           A abelha Mirim-emerina, *Plebeia emerina* (Friese, 1900), e a abelha Jataí, *Tetragonisca*  
66 *fiabrigi* (Schwarz, 1938) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), são exemplos de espécies de  
67 abelhas sem ferrão que podem ser utilizadas tanto na meliponicultura como no complemento  
68 de polinização de culturas agrícolas. Ambas espécies estão presentes nos estados do Paraná,  
69 Rio Grande do Sul e Santa Catarina e são visitantes florais de macieira, morangueiro e canola,  
70 por exemplo (Orth 1984; Ortolan and Laroca 1996; Michener 2013; Piovesan 2018).

71           Quando forrageiam em ambientes cultivados, as abelhas sem ferrão são expostas a  
72 diversas substâncias potencialmente tóxicas utilizadas para o controle de pragas, como  
73 herbicidas, fungicidas e inseticidas (Sanchez-Bayo e Goka 2016). A toxicidade de inseticidas  
74 para as abelhas tem como base a determinação de uma dose média letal ( $DL_{50}$ ) ou uma  
75 concentração média letal ( $CL_{50}$ ) representando, respectivamente, uma dose ou concentração

76 capaz de causar a mortalidade de 50% da população experimental (Desneux et al. 2007; Guedes  
77 et al. 2016). Além de considerar a mortalidade letal, é importante analisar os efeitos  
78 denominados subletais, que não provocam diretamente a mortalidade, mas que podem estar  
79 associadas ao comprometimento das atividades dos indivíduos e conseqüentemente ao declínio  
80 da colônia (Thompson e Maus 2007; Freitas e Pinheiro 2010).

81 Recentemente, estudos têm demonstrado graves distúrbios em colmeias de abelhas  
82 melíferas e nativas, decorrentes da exposição prolongada a baixas doses ou concentrações de  
83 inseticidas, que afetam a memória, aprendizagem e capacidade de forrageio das abelhas (Tosi  
84 et al. 2017; Alkassab e Kirchner 2018; Siviter et al. 2018). Em abelhas eussociais, a  
85 contaminação das forrageiras pode impactar indiretamente o desempenho de toda a colônia,  
86 através do envenenamento horizontal de centenas operárias, e até mesmo da rainha. Esse tipo  
87 de contaminação acontece, pois nesses grupos de abelhas os indivíduos adquirem alimentos  
88 através da trofalaxia que consiste na troca líquida horizontal entre membros da colônia ou  
89 compartilhando recursos dentro do ninho (Contrera et al., 2010; Williams et al., 2015; Wu-  
90 Smart e Spivak, 2016).

91 Haja vista a importância das abelhas nativas como complemento e/ou alternativa nos  
92 serviços de polinização e a escassez de estudos toxicológicos que avaliem efeitos de  
93 concentrações subletais nessas espécies, este trabalho teve como objetivo conhecer os efeitos  
94 de concentrações subletais dos inseticidas acetamiprido, espinosade, malationa e fosmete sobre  
95 a atividade locomotora, de voo e a percepção à sacarose das abelhas sem ferrão *P. emerina* e *T.*  
96 *fiebrigi*.

97

## 98 **Material e Métodos**

99 *Insetos*

100 Foram utilizados exemplares de operárias adultas das espécies *P. emerina* e *T. fiebrigi*,  
101 criadas no meliponário experimental da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade  
102 Federal de Pelotas (cadastro SisGen A7B64FD). Para a coleta, foram verificadas as condições  
103 de saúde e o estado fisiológico, de acordo com as diretrizes para testes químicos em abelhas  
104 (OECD 1998). Foram coletadas abelhas de três colmeias distintas não parentais (para garantir  
105 a variabilidade genética), em dias ensolarados com temperatura acima de 18°C. Para os  
106 experimentos de atividade locomotora e de reflexo de extensão da probóscide (REP), as  
107 operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi*, que se localizavam na parte superior da colmeia, foram  
108 coletadas em grupos através de sugador entomológico e pinça, respectivamente. Para os  
109 experimentos de voo foram coletas as forrageiras que se localizavam na saída da colmeia, em  
110 direção ao forrageamento, através de sugador entomológico.

111 As abelhas coletadas foram acondicionadas em gaiolas compostas por potes plásticos  
112 transparentes com capacidade de 250 mL (diâmetro interno: 90 x 60 mm; diâmetro externo:  
113 105 x 65 mm). Para a manutenção das abelhas, a gaiola teve o fundo do pote forrado com papel  
114 filtro e na parte superior acoplado um tubo Eppendorf® (com capacidade de 1,5 mL) para a  
115 oferta do alimento. Após a coleta, as abelhas foram levadas ao laboratório de Manejo Integrado  
116 de Pragas (LabMIP/UFPel) e mantidas em salas climatizadas (temperatura: 28±1 °C; UR:  
117 70±2%; escotofase de 24 horas). A fim de minimizar o estresse ocasionado pelo confinamento,  
118 previamente ao início dos testes, as abelhas permaneceram em adaptação por 24 horas, sendo  
119 alimentadas com solução de sacarose (50% v/v).

## 120 *Inseticidas*

121 Quatro formulações comerciais de inseticidas registradas e usadas para o manejo de  
122 pragas na fruticultura brasileira (BRASIL 2018; PIC 2018; PIM 2018) foram selecionadas para  
123 a condução dos bioensaios em duas concentrações subletais (CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub>): i) Mospilan®  
124 (acetamiprido 200 g ai/L) (Iharabras SA Indústrias Químicas, Sorocaba, SP); ii) Malathion

125 1000 EC<sup>®</sup> (malationa 1000 g ai/L) (FMC Química do Brasil Ltda., Campinas, SP, Brasil); iii)  
126 Tracer 480 SC<sup>®</sup> (espinosade 480 g ai/L) (Dow AgroSciences Industrial Ltda., São Paulo, SP);  
127 iv) Imidan 500 WP<sup>®</sup> (fosmete 500 g ai/kg) (Cross Link Consultoria e Comércio Ltda. Barueri,  
128 SP). As doses subletais dos inseticidas avaliados foram obtidas, para cada espécie de abelha,  
129 pela autora e descritos no capítulo 01 desta tese, para *P. emerina* foram obtidos os seguintes  
130 valores: acetamiprido CL<sub>10</sub> = 1499,74 ng ai/μL dieta e CL<sub>50</sub> = 4204,06 ng ai/μL dieta, malationa  
131 CL<sub>10</sub> = 3,44 ng ai/μL dieta e CL<sub>50</sub> = 26,01 ng ai/μL dieta, fosmete CL<sub>10</sub> = 3,44 ng ai/μL dieta e  
132 CL<sub>50</sub> = 26,01 ng ai/μL dieta e espinosade CL<sub>10</sub> = 1,79 ng ai/μL dieta e CL<sub>50</sub> = 4,96 ng ai/μL  
133 dieta; para *T. fiebrigi* foram obtidos os seguintes valores: acetamiprido CL<sub>10</sub> = 1031,67 ng ai/μL  
134 dieta e CL<sub>50</sub> = 9841,32 ng ai/μL dieta, malationa CL<sub>10</sub> = 5,39 ng ai/μL dieta e CL<sub>50</sub> = 8,39 ng  
135 ai/μL dieta, fosmete CL<sub>10</sub> = 24,33 ng ai/μL dieta e CL<sub>50</sub> = 53,91 ng ai/μL dieta e espinosade  
136 CL<sub>10</sub> = 2,19 ng ai/μL dieta e CL<sub>50</sub> = 5,65 ng ai/μL dieta.

137 As formulações dos inseticidas diluídas em água destilada, nas concentrações subletais,  
138 foram veiculadas mediante dieta (sacarose/água, v/v 50%), acondicionadas em tubos  
139 Eppendorf<sup>®</sup> com um orifício no fundo de forma que as abelhas tivessem acesso ao alimento  
140 contaminado. Para induzir o consumo do alimento oferecido às abelhas, os indivíduos foram  
141 privados de alimentação por um período de duas horas antes do início dos experimentos. Após  
142 o período de jejum cada grupo de abelhas recebeu 1.00 mL de alimento contaminado e sem  
143 inseticida. Após quatro horas de oferta de alimento contaminado, o alimentador foi substituído  
144 por um novo, contendo apenas solução de sacarose *ad libitum*.

#### 145 *Bioensaios de comportamento*

146 Os bioensaios de atividade locomotora foram realizados 04 e 24 horas após a exposição  
147 aos inseticidas, já os bioensaios de REP foram realizados 24 horas após a exposição, ambos no  
148 LabMIP/UFPel (Temperatura = 25 ± 2 °C; Umidade Relativa = 60 ± 10%). Os bioensaios de

149 atividade de voo foram realizados em uma sala escura do LabMIP/UFPel (Temperatura =  $25 \pm$   
150  $2 \text{ }^\circ\text{C}$ ; Umidade Relativa =  $60 \pm 10\%$ ), 04 e 24 horas após a exposição aos inseticidas.

#### 151 *Atividade locomotora*

152 Após a contaminação das operárias com as concentrações subletais dos inseticidas, as  
153 abelhas foram individualizadas e liberadas individualmente na extremidade inferior de um tubo  
154 de silicone com comprimento total de 60 cm (Figura 1). Uma lâmpada fluorescente (60 W, 800  
155 lumens) foi usada no final deste tubo para estimular a locomoção das abelhas em direção à fonte  
156 luminosa. A distância de caminhamento máxima avaliada foi de 50 cm. O tempo que cada  
157 indivíduo levou para percorrer essa distância em direção à fonte de luz foi registrado. Baseado  
158 em experimentos preliminares com abelhas não tratadas, o período máximo avaliado para cada  
159 indivíduo foi de 60 segundos, após esse tempo o teste foi encerrado e a distância contabilizada.  
160 Posteriormente, a velocidade média de cada abelha foi calculada. Foram avaliadas 90 abelhas  
161 por tratamento, no delineamento inteiramente casualizado.

#### 162 *Atividade de voo (decolagem)*

163 Após a contaminação das operárias com as concentrações subletais dos inseticidas, as  
164 abelhas foram individualizadas e liberadas individualmente na extremidade inferior de uma  
165 caixa de madeira (50 cm de largura x 38 cm de altura x 10 cm de profundidade) (Figura 2).  
166 Uma lâmpada fluorescente (60 W, 800 lumens) foi usada na parte superior da caixa para  
167 estimular decolagem das abelhas em direção à fonte luminosa. Foi avaliada a decolagem das  
168 operárias em direção a luz. O bioensaio explorou o voo da abelha em direção à fonte de luz  
169 depois que o inseto foi liberado no fundo inferior lateral da torre, e a decolagem do voo (ou  
170 falta dela) foi registrada dentro de sessenta segundos da liberação da operária. A atividade de  
171 vôo foi estratificada da seguinte forma: i) nenhum voo (isto é, abelha permaneceu na base da  
172 caixa), ii) vôo até 5 cm de altura, iii) vôo entre 06 e 15 cm de altura, iv) vôo entre 16 e 25 cm

173 de altura e v) voo atingindo a fonte de luz a 30 cm de altura. Foram avaliadas 90 abelhas por  
174 tratamento, no delineamento inteiramente casualizado.

175 *Reflexo da extensão da probóscide (REP) não condicionado – Sensibilidade à sacarose*

176 A metodologia do teste de reflexo da extensão da probóscide (REP) foi adaptada de  
177 Nocelli et al. (2018). Após 24 horas da contaminação das operárias com as concentrações  
178 subletais (CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub>) dos inseticidas, as abelhas foram individualizadas e acondicionadas em  
179 cápsulas plásticas confeccionadas a partir de tubos Eppendorf® (200 µL) (Figura 3A) de forma  
180 que a parte da cabeça da operária ficou exposta, mas o corpo permaneceu no interior da  
181 cápsula com seus movimentos livres. As abelhas testadas, foram mantidas 2 horas de jejum e  
182 após esse período foram expostas à concentrações crescentes de sacarose: 10%, 30%, 50%,  
183 70% e 80%, água foi utilizada como controle. As concentrações de sacarose foram oferecidas  
184 às operárias através de uma pequena gota em microseringa que era direcionada próxima a  
185 antena de cada indivíduo por um período de dez segundos (Figuras 3B e 3C), cada concentração  
186 foi oferecida intercaladas com o oferecimento de água. O efeito das concentrações subletais dos  
187 inseticidas foi determinado avaliando a extensão da probóscide como uma resposta positiva  
188 (Figuras 3B e 3C) utilizando 30 abelhas por tratamento com três repetições, o experimento foi  
189 realizado utilizando o delineamento inteiramente casualizado.

190 *Análises estatísticas*

191 A normalidade dos dados foi verificada através de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade  
192 das variâncias por Bartlett. Os dados que apresentaram distribuição normal, foi realizada a  
193 análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).  
194 Já para os dados que apresentaram distribuição não-paramétrica, foi realizado o teste de Kruskal  
195 Wallis, sendo as médias comparadas pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni ( $P < 0,05$ ).  
196 Utilizou-se o programa R® (R Development Core Team 2015) para execução das análises dos  
197 experimentos.

198

199 **Resultados**

200 A exposição aos inseticidas causou alterações na atividade locomotora das abelhas e  
201 variou de acordo com a espécie, concentração, inseticida e período avaliado (Figura 04). O  
202 inseticida acetamiprido nas concentrações CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub> causou redução na velocidade média  
203 das operárias de *P. emerina* (H = 16,95; df = 2; P <0,0001) e *T. fiebrigi* (H = 11,28; df = 2; P  
204 = 0,003), quatro horas após a exposição. Quando avaliado às 24 horas após a exposição,  
205 somente a CL<sub>50</sub> afetou a velocidade das operárias de *P. emerina* (H = 11,19; df = 2; P = 0,003)  
206 e a CL<sub>10</sub> reduziu a velocidade de *T. fiebrigi* (H = 6,93; df = 2; P = 0,03) (Figura 4).

207 Malationa, nas duas concentrações subletais, reduziu a velocidade média de *P. emerina*  
208 (H = 16,64; df = 2; P <0,0001) e *T. fiebrigi* (H = 6,79; df = 2; P = 0,03) 4 horas após a exposição.  
209 No entanto, após 24 horas, não houve diferença significativa, entre as doses e o controle para  
210 as duas abelhas (*P. emerina* H = 2,17; df = 2; P = 0,33; *T. fiebrigi*: H = 1,55; df = 2; P = 0,46).  
211 Da mesma forma, fosmete reduziu a velocidade média das operárias de *P. emerina* quatro horas  
212 após a exposição aos inseticidas (H = 9,05; df = 2; P = 0,01), mas não alterou a velocidade  
213 percorrida destas após 24 horas (H = 1,64; df = 2; P = 0,44). Já para a abelha *T. fiebrigi* somente  
214 a CL<sub>50</sub> de fosmete reduziu a velocidade média das abelhas nos dois períodos avaliados (4 h: H  
215 = 6,67; df = 2; p = 0,03 e 24 h: H = 14,85; df = 2; P <0,0001) (Figura 4).

216 Operárias de *P. emerina* expostas ao inseticida espinosade apresentaram menor  
217 velocidade média no percurso quando comparadas ao controle quatro horas após a exposição  
218 (H = 36,34; df = 2; P <0,0001), às 24 horas após a exposição ao inseticida somente a CL<sub>50</sub> (H  
219 = 12,31; df = 2; P <0,0001) reduziu significativamente a velocidade das abelhas contaminadas,  
220 quando comparadas ao controle. A atividade locomotora de *T. fiebrigi* foi alterada e a  
221 velocidade média de abelhas contaminadas pela CL<sub>50</sub> de espinosade foram significativamente  
222 mais lentas quatro horas após a exposição (H = 6,31; df = 2; p = 0,04), entretanto 24 horas após

223 a exposição tanto a CL<sub>10</sub> quanto a CL<sub>50</sub> deste inseticida reduziu a velocidade das abelhas  
224 contaminadas ( $H = 33.93$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0.0001$ ) (Figura 4).

225 Os inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade afetaram o desempenho  
226 de vôo das abelhas forrageiras das duas espécies (Figuras 5 e 6). A exposição à doses subletais  
227 desses inseticidas prejudicou a decolagem das operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi*, sendo  
228 observado número significativamente maior de operárias contaminadas que não realizaram a  
229 decolagem, permanecendo no fundo da caixa, em relação às abelhas não contaminadas que em  
230 sua maioria conseguiram decolar em direção a luz (Figuras 5 e 6).

231 *P. emerina* teve a sua capacidade de decolagem alterada quando contaminadas com as  
232 CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub> dos inseticidas acetamiprido ( $H = 6,95$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,03$ ), fosmete ( $H = 7,51$ ;  $df =$   
233  $2$ ;  $P = 0,02$ ), malationa ( $H = 7,57$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,02$ ) e espinosade ( $H = 7,44$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,02$ )  
234 nas quatro primeiras horas após a exposição, reduzindo significativamente o número médio de  
235 operárias que conseguiram atingir a luz. Entretanto, somente os inseticidas acetamiprido ( $F =$   
236  $163,5$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0,0001$ ) e espinosade ( $F = 251,6$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0,0001$ ) afetaram o voo das  
237 operárias após 24 horas, onde as CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub> reduziram significativamente a altura de voo das  
238 abelhas contaminadas em relação ao controle. Somente a CL<sub>50</sub> dos inseticidas fosmete ( $H =$   
239  $7,71$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,02$ ) e malationa ( $F = 10,5$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,01$ ) alterou o comportamento de  
240 decolagem das abelhas às 24 horas (Figura 5).

241 O voo das operárias de *T. fiebrigi* expostas as CL<sub>10</sub> e CL<sub>50</sub> dos inseticidas acetamiprido  
242 ( $H = 7,26$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,03$ ), malationa ( $F = 89,82$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0.0001$ ), fosmete ( $F = 151,2$ ;  $df$   
243  $= 2$ ;  $P < 0.0001$ ) e espinosade ( $H = 5.63$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.04$ ) foi altamente comprometido, com  
244 redução significativa das abelhas que conseguiram decolar até uma altura de 30 cm, quatro  
245 horas após a exposição, em contraste com as abelhas não expostas, que foram em grande parte  
246 capazes de atingir a fonte de luz (Figura 6). As duas concentrações subletais dos inseticidas  
247 acetamiprido ( $H = 7,20$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,03$ ), fosmete ( $H = 7,18$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,03$ ) e espinosade ( $F$

248 = 546;  $df = 2$ ;  $P < 0,0001$ ) também afetaram a altura de voo das abelhas significativamente  
249 quando comparadas com as abelhas do tratamento controle 24 horas após a exposição,  
250 entretanto, nesse período de avaliação somente a  $CL_{50}$  de malationa ( $H = 7,51$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,02$ )  
251 afetou significativamente a decolagem das abelhas (Figura 6).

252 Observou-se que a exposição das abelhas *P. emerina* e *T. fiebrigi* às doses sub-letais dos  
253 inseticidas testados, afetou negativamente a capacidade destas em reconhecer o alimento  
254 quando este foi oferecido e entrou em contato com as antenas (Tabelas 1 e 2).

255 As operárias de *P. emerina* não contaminadas, não apresentaram nenhum estímulo  
256 quando expostas à água que foi utilizado como tratamento controle. Resposta negativa similar  
257 foi apresentada pelas abelhas contaminadas por malationa e pela  $CL_{10}$  de acetamiprido.  
258 Entretanto, abelhas contaminadas com  $CL_{50}$  de acetamiprido e  $CL_{10}$  e  $CL_{50}$  de fosmete e  
259 espinosade apresentaram resposta positiva já quando entraram em contato com a água (Tabela  
260 1). As abelhas não contaminadas apresentaram alta resposta positiva já nas primeiras  
261 concentrações de sacarose (10% e 30%) oferecidas, por outro lado, as abelhas contaminadas  
262 pelos inseticidas acetamiprido, fosmete e pela  $CL_{50}$  de malationa e espinosade não apresentaram  
263 o mesmo reflexo de reconhecimento do alimento quando foi oferecida a sacarose 10% e 30%.  
264 Quando oferecida sacarose 50%, as abelhas contaminadas com o inseticida acetamiprido e pela  
265  $CL_{50}$  de malationa apresentaram o menor número de indivíduos com resposta positiva diferindo  
266 significativamente das abelhas não contaminadas. Os inseticidas acetamiprido, malationa e a  
267  $CL_{50}$  de fosmete e espinosade afetaram o reconhecimento das operárias para as concentrações  
268 de sacarose 70% e 80% e diferiram significativamente das abelhas sadias (Tabela 1).

269 As operárias de *T. fiebrigi* contaminadas pelo inseticida espinosade já apresentaram  
270 reflexo da probóscide quando expostas a água. As operárias não contaminadas apresentaram  
271 um comportamento crescente de percepção da sacarose e extensão da probóscide em relação ao  
272 aumento da concentração de açúcar. Além disso, todos os inseticidas testados afetaram a

273 capacidade das abelhas em reconhecer a fonte alimentar em todas as concentrações de sacarose  
274 oferecidas, diferindo das abelhas não contaminadas (Tabela 2).

275

## 276 **Discussão**

277 A exposição das abelhas à concentrações subletais de inseticidas altera o  
278 comportamento, capacidade de aprendizagem, orientação, forrageamento e cuidados de cria das  
279 operárias, isto é, efeitos que não causam diretamente a morte de um indivíduo (Thompson e  
280 Maus 2007). Entretanto, à medida que os inseticidas afetam a atividade que essas abelhas  
281 realizam dentro do ninho podem comprometer a colmeia como um todo, pois as alterações  
282 comportamentais dos indivíduos alteram diretamente o funcionamento da colônia, tornando-a  
283 mais fraca e menos produtiva ao longo do tempo, o que pode causar altas taxas de mortalidade  
284 em um período prolongado (Desneux et al. 2007; Brittain e Potts 2011).

285 No presente trabalho pode-se observar que a atividade locomotora, de voo e o reflexo  
286 da extensão da probóscide das abelhas foram alterados na presença de doses subletais (CL<sub>10</sub> e  
287 CL<sub>50</sub>) dos inseticidas acetamiprido (Neonicotinoide), malationa (Organofosforado), fosmete  
288 (Organofosforado) e espinosade (Espinosina). Estudos relatam que os principais efeitos  
289 comportamentais causados pela intoxicação de inseticidas às abelhas variam de acordo com a  
290 dose e tempo de exposição e são caracterizados como distúrbios de coordenação motora,  
291 tremores, efeito *knock down* (choque imediato, imobilização do inseto que pode, ou não, se  
292 recuperar), prostração, paralisia, deficiência no aprendizado e memória olfativa, dificuldade  
293 locomotora, incapacidade de voo e diminuição da longevidade (Souza et al. 2006; Carvalho et  
294 al. 2009).

295 Os inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade reduziram a atividade  
296 locomotora e a capacidade de decolagem (voo) de *P. emerina* e *T. fiebrigi* nas primeiras horas  
297 após a exposição (4 horas). Essa resposta de curto prazo aos inseticidas pode ter ocorrido pela

298 ação neurotóxica destes que, geralmente ocorre por meio da hiperexcitação e demais sintomas  
299 de intoxicação que são observados na presença destes inseticidas que incluem espasmos e  
300 desorientação, o que dificulta a movimentação. Williamson et al. (2013) relataram que a  
301 exposição à doses subletais de inibidores da acetilcolinesterase (AChE) (Organofosforados)  
302 afetou a função motora de *A. mellifera*, além disso, observaram que as abelhas caminhavam  
303 menos, tinham menor probabilidade de endireitar-se após a queda, exibiram movimentos  
304 abdominais estranhos e espasmos.

305 O efeito dos inibidores da AChE na função motora também pode ser refletido na  
306 interrupção no comportamento de voo das operárias. De fato, esse efeito pode ser especialmente  
307 profundo para as forrageiras, pois, relata-se que as forrageiras de abelhas melíferas exibem  
308 níveis mais baixos de AChE no cérebro quando comparadas com abelhas mais novas (Shapira  
309 et al. 2001). Provavelmente, essa redução nos níveis de AChE pode ocorrer nas forrageiras de  
310 abelhas sem ferrão também, o que explicaria a redução da capacidade de decolagem dessas  
311 abelhas dentro da caixa em direção a luz e o número elevado de abelhas que permaneceram no  
312 chão da caixa nas primeiras horas após a exposição aos inseticidas Organofosforados.

313 A acetilcolina é um importante neurotransmissor dos insetos (Bicker 1999) e os sítios  
314 de ligação à acetilcolina estão amplamente presentes no cérebro das abelhas (Scheidler et al.  
315 1990). Nesse inseto, diversas funções parecem ser apoiadas pela neurotransmissão colinérgica  
316 (Dacher et al. 2005; Thany e Gauthier 2005). Portanto, mesmo doses subletais de  
317 Neonicotinoides podem afetar as abelhas, pois atuam nos receptores nicotínicos de acetilcolina  
318 (nAChRs), onde atuam como agonistas (Gauthier 2010; Casida e Durkin 2013).

319 Lambin et al. (2001) e Decourtye et al. (2004) demonstraram que abelhas que ingeriam  
320 imidacloprido em doses subletais exibiam um comprometimento da atividade locomotora, e  
321 sensibilidade à sacarose. El Hassani et al. (2008) observaram que doses subletais de  
322 acetamiprido apresentaram diminuição significativa na duração da mobilidade das abelhas

323 melíferas contaminadas, entretanto, não observaram diferenças na capacidade de voo dos  
324 indivíduos.

325 O Neonicotinoide imidacloprido também apresentou alteração no comportamento da  
326 abelha sem ferrão *Melipona quadrifasciata* Lepeletier, onde operárias contaminadas exibiram  
327 uma atividade de grupo média cerca de quatro vezes menor do que abelhas não contaminadas  
328 três horas após a exposição (Tomé et al. 2015). Charreton et al. (2015) e Tosi et al. (2017)  
329 observaram que após 24-48 horas após a aplicação do tiametoxam, forrageiras de *A. mellifera*  
330 também apresentaram menor mobilidade e atividade de voo.

331 Além disso, imidacloprido e espinosade afetaram a capacidade de decolagem dessas  
332 abelhas e seu direcionamento até a fonte luminosa (Tomé et al. 2015). Os efeitos negativos das  
333 Espinosinas sobre abelhas destacam a importância de se conhecer os riscos impostos por novos  
334 inseticidas, principalmente bioinseticidas, apesar de sua origem natural que sustenta seu uso  
335 aumentado por sua aparente segurança ambiental.

336 No presente trabalho, espinosade prejudicou a atividade locomotora e de voo das  
337 abelhas, podendo comprometer a atividade de forrageamento e conseqüentemente a  
338 manutenção e sobrevivência da colmeia (Blacquièrre et al., 2012; Henry et al., 2012). Este fato  
339 pode estar relacionado à ação neurotóxica desses inseticidas, que atuam através de moduladores  
340 alostéricos de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) não dessensibilizantes em suas  
341 sinapses colinérgicas (Kirst 2010; Jeschke et al. 2011).

342 Estudos laboratoriais com espinosade corroboram com os resultados presentes e relatam  
343 seu impacto negativo em abelhas melíferas e nativas (Mayes et al. 2003; Bailey et al. 2005;  
344 Morandin et al. 2005; Tomé et al. 2015), entretanto esse efeito negativo não foi evidente em  
345 estudos de campo (Scott-Dupree et al. 2009; Biondi et al. 2012).

346 Concentrações subletais dos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade  
347 afetaram a sensibilidade gustativa da sacarose por operárias das abelhas sem ferrão *P. emerina*

348 e *T. fiebrigi* quando comparadas com abelhas não contaminadas. Além disso, foi observado que  
349 acetamiprido, fosmete e espinosade afetaram o REP de *P. emerina* para água, enquanto que  
350 somente espinosade afetou o REP em *T. fiebrigi*. Este efeito do acetamiprido é consistente com  
351 o descrito de drogas nicotínicas na sensibilidade à sacarose (Thany e Gauthier 2005).  
352 Acetamiprido também afetou a sensibilidade gustativa da sacarose e o REP para água por  
353 operárias de *A. mellifera* (El Hassani et al. 2008). Thany et al. (2015), sugerem que estes  
354 inseticidas provavelmente tenham efeito na necessidade das abelhas à água, pois também  
355 observaram aumento de resposta REP à água em operárias de abelhas contaminadas com  
356 acetamiprido.

357         Testes em laboratório demonstram que o reflexo de extensão da probóscide provocado  
358 pela estimulação da sacarose das antenas pode ser usado como uma ferramenta ecotoxicológica  
359 para testar diferentes funções comportamentais nas abelhas (Mammood e Waller 1990; Pham-  
360 Delègue et al. 2002), tais como avaliar o efeito subletal dos inseticidas na sensibilidade à  
361 sacarose (Lambin et al. 2001; Decourtye et al. 2005; El Hassani et al. 2005; Goñalons e Farina  
362 2018). A integridade dessas funções é necessária para o comportamento de forrageamento, por  
363 exemplo, a percepção do açúcar é importante para as abelhas para tomada de decisões de  
364 forrageio (Pankiw e Page 1999). O processo de detecção de alimentos envolve atividade  
365 nervosa sofisticada que pode ser interrompida por pesticidas neurotóxicos (Haynes 1988), como  
366 os inseticidas testados nesse trabalho.

367         A metodologia REP foi desenvolvida para a abelha *A. mellifera* (Toda et al., 2009),  
368 dessa forma o protocolo original REP pode não ser perfeitamente adequado para abelhas não-  
369 Apis, explicando o fraco desempenho de abelhas sem ferrão quando submetidas a este teste (Mc  
370 Cabe et al. 2007; Mc Cabe e Farina 2009, 2010; Roselino and HrnCir, 2012). Nocelli et al.  
371 (2018) desenvolveram uma nova metodologia eficiente de avaliação de REP não condicionado  
372 em abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris* Latreille e *Scaptotrigona postica* (Latreille), com

373 o diferencial de que as abelhas permanecem livres dentro do tubo Eppendorf® e mostrou  
374 aumento em respostas positivas às concentrações crescentes de sacarose em relação ao método  
375 padrão para *A. mellifera*.

376 A metodologia desenvolvida neste trabalho é uma adaptação do protocolo padrão e do  
377 adaptado para abelhas sem ferrão, onde os insetos são presos nos tubos Eppendorf® ficando  
378 com as antenas e a cabeça expostas, enquanto que o restante do corpo fica no interior do tubo,  
379 mas tem seus movimentos preservados. Essa metodologia mostrou-se eficiente para avaliar a  
380 resposta das abelhas de *P. emerina* e *T. fiebrigi* à sacarose, pois foram observados altos índices  
381 de resposta positiva conforme foi aumentada a concentração de sacarose.

382 Este trabalho traz informações pioneiras dos efeitos subletais de acetamiprido  
383 acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade, os quais afetaram negativamente a atividade  
384 locomotora, de voo e reflexo da extensão da probóscide das abelhas, alterando o deslocamento,  
385 orientação e capacidade de reconhecimento da fonte de alimento dessas operárias. Esses efeitos  
386 podem comprometer atividades realizadas por esses indivíduos dentro da colônia impactando  
387 na sobrevivência e na viabilidade da colônia, bem como na polinização e na produção de  
388 alimentos. Além disso, as informações deste trabalho podem fornecer informações importantes  
389 para que estudos posteriores em campo sejam realizados.

390

### 391 **Agradecimentos**

392 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
393 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores  
394 também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
395 (CNPq) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Centro Nacional de  
396 Pesquisa Uva e Vinho pela concessão de bolsas de estudos e suporte financeiro.

397

398 **Referências**

- 399 Alkassab, A. T., Kirchner, W. H. (2018) Assessment of acute sublethal effects of clothianidin  
400 on motor function of honeybee workers using video-tracking analysis. *Ecotoxicology and*  
401 *Environmental Safety*, **147**, 200-205
- 402 Bailey, J., Scott-Dupree, C., Harris, R., Tolman, J., Harris, B. (2005) Contact and oral toxicity  
403 to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in  
404 Ontario, Canada. *Apidologie*, **36**(4), 623-633
- 405 Bicker, G. (1999) Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and  
406 mushroom bodies of the honeybee. *Microscopy research and technique*, **45**(3), 174-183
- 407 Biondi, A., Mommaerts, V., Smaghe, G., Vinuela, E., Zappala, L., Desneux, N. (2012) The  
408 non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods. *Pest management science*, **68**(12),  
409 1523-1536.
- 410 Blacquiere, T., Smaghe, G., Van Gestel, C. A., Mommaerts, V. (2012) Neonicotinoids in bees:  
411 a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, **21**(4), 973-992
- 412 Brasil (2018) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Agrofit.  
413 [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons).
- 414 Brittain C., Potts S. G. (2011) The potential impacts of insecticides on the life-history traits of  
415 bees and the consequences for pollination. *Basic Appl Ecol*, **12**, 321–331
- 416 Carvalho, S. M., Carvalho, G. A., Carvalho, C. F., Bueno Filho, J. S. S., & Baptista, A. P. M.  
417 (2009) Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha  
418 africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). *Arquivos do Instituto*  
419 *Biológico*, **76**(4), 597-606
- 420 Casida, J. E., Durkin, K. A. (2013) Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and  
421 secondary effects. *Annual review of entomology*, **58**, 99-117

- 422 Cortopassi-Laurino, M., Imperatriz-Fonseca, V.L., Roubik, D.W., Dollin, A. et al. (2006)  
423 Global meliponiculture: challenges and opportunities. *Apidologie* **37**, 275-292
- 424 Charreton, M., Decourtye, A., Henry, M., Rodet, G., Sandoz, J. C., Charnet, P., Collet, C.  
425 (2015) A locomotor deficit induced by sublethal doses of pyrethroid and neonicotinoid  
426 insecticides in the honeybee *Apis mellifera*. *PloS one*, **10**(12), e0144879
- 427 Dacher, M., Lagarrigue, A., Gauthier, M. (2005) Antennal tactile learning in the honeybee:  
428 effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience*, **130**(1), 37-50
- 429 Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S., & Pham-  
430 Delegue, M. H. (2005) Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning  
431 performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of environmental contamination and*  
432 *toxicology*, **48**(2), 242-250
- 433 Desneux, N., Decourtye, A., Delpuech, J. M. (2007) The sublethal effects of pesticides on  
434 beneficial arthropods. *Annu Rev Entomol* **52**, 81-106
- 435 El Hassani, A. K., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M., Armengaud, C. (2008)  
436 Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee  
437 (*Apis mellifera*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, **54**(4), 653-661
- 438 Freitas, B. M., Pinheiro, J. N. (2010) Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos  
439 no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. *Oecologia australis*, **14**(1), 282-  
440 298
- 441 Freitas, B. M., Nunes-Silva, P. (2012) Polinização agrícola e sua importância no Brasil,  
442 in: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., CANHOS, D. A., ALVES, D. A., SARAIVA, A. M.  
443 (Eds.), *Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso*  
444 *sustentável, conservação e serviços ambientais*. São Paulo: EDUSP, pp. 103-118

- 445 Gauthier, M. (2010) State of the art on insect nicotinic acetylcholine receptor function in  
446 learning and memory. In *Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors*. Springer, New York, NY,  
447 97-115
- 448 Goñalons, C. M., Farina, W. M. (2018) Impaired associative learning after chronic exposure to  
449 pesticides in young adult honey bees. *Journal of Experimental Biology*, **221**(7), jeb176644
- 450 Guedes, R. N. C., Smagghe, G., Stark, J. D., Desneux, N. (2016) Pesticide-induced stress in  
451 arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annu Rev Entomol* **61**,  
452 43-62
- 453 Haynes, K. F. (1988) Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. *Annu.*  
454 *Rev. Entomol.* **33**, 149-68
- 455 Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O. (2012) A common pesticide decreases foraging  
456 success and survival in honey bees. *Science* **336**, 348-350
- 457 Jeschke, P., Nauen, R., Sparks, T. C., Loso, M. R., Watson, G. B., Babcock, J. M., Kramer, J.  
458 V., Zhu, Y., Nugent, B. M., Thomas, J. D., Crouse, G. D., Dripps, J. E., Waldron, C., Salgado,  
459 V. L., Schnatterer, S., Holmes, K. A., Pitterna, T. (2011) Nervous System. *Modern crop*  
460 *protection compounds*, 1127-1326
- 461 Kirst H. A. (2010) The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural  
462 products research. *J Antibiot* 63:101
- 463 Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., Gauthier, M. (2001) Imidacloprid-induced  
464 facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect*  
465 *Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of*  
466 *America*, **48**(3), 129-134.
- 467 Magalhães, T. L., Venturieri, G. C. (2010) Aspectos econômicos da criação de abelhas  
468 indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no Nordeste paraense. *Embrapa Amazônia Oriental*,  
469 Belém

- 470 Mamood, A. N., Waller, G. D. (1990) Recovery of learning responses by honeybees following  
471 a sublethal exposure to permethrin. *Physiological Entomology*, **15**(1), 55-60
- 472 Mayes, M. A., Thompson, G. D., Husband, B., Miles, M. M. (2003) Spinosad toxicity to  
473 pollinators and associated risk. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*,  
474 37-71.
- 475 Mc Cabe, S. I., Hartfelder, K., Santana, W. C., Farina, W. M. (2007) Odor discrimination in  
476 classical conditioning of proboscis extension in two stingless bee species in comparison to  
477 Africanized honeybees. *Journal of Comparative Physiology A*, **193**(11), 1089-1099
- 478 Mc Cabe, S. I., Farina, W. M. (2010). Olfactory learning in the stingless bee *Tetragonisca*  
479 *angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Journal of Comparative Physiology A*, **196**(7),  
480 481-490.
- 481 Michener, C. D. (2013) *The meliponini*. In *Pot-honey* Springer, New York
- 482 Morandin, L. A., Winston, M. L., Franklin, M. T., Abbott, V. A. (2005) Lethal and sub-lethal  
483 effects of spinosad on bumble bees (*Bombus impatiens* Cresson). *Pest Management Science:*  
484 *formerly Pesticide Science*, **61**(7), 619-626
- 485 Nocelli, R. C. F., Lourenço, C. T., Denardi-Gheller, S. E., Malaspina, O., Pereira, A. M.,  
486 Nominato, F. C. (2018) New method to Proboscis Extension Reflex to the assessment of  
487 gustatory responses for stingless bees. *Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente*, **7**(1), 69-76.
- 488 Nogueira-Neto, P. (1997) *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão*.
- 489 OECD (1998) Organization for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the  
490 testing of chemicals: Honeybees, acute oral toxicity test. Environmental health safety division,  
491 organisation for economic co-operation and development Number 213, Paris, France
- 492 Orth, A. I. (1984) Levantamento das abelhas nativas (Hym., Apoidea) associadas às flores da  
493 macieira (*Pyrus malus* L.). *Anais V Cong Bras Ap* 280-287

- 494 Ortolan S. M. L. S., Laroca, S. (1996) Melissocenótica em áreas de cultivo de macieira (*Pyrus*  
495 *malus* L.) em Lages (Santa Catarina), com notas comparativas e experimento de polinização  
496 com *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera, Apoidea). Acta Biol Parana **25**, 111-113
- 497 Pankiw, T., Page Jr, R. E. (1999) The effect of genotype, age, sex, and caste on response  
498 thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). Journal of  
499 Comparative Physiology A, **185**(2), 207-213
- 500 Pham-Delègue, M. H., Decourtye, A., Kaiser, L., Devillers, J. (2002). Behavioural methods to  
501 assess the effects of pesticides on honey bees. Apidologie, **33**(5), 425-432
- 502 PIC (2018) Lista PIC – Produção Integrada de Citrus. Grade de inseticidas, acaricidas,  
503 fungicidas da produção integrada de citrus – PIC BRASIL. Disponível em  
504 [https://www.fundecitrus.com.br/pdf/Grade\\_de\\_Agrotoxicos\\_03.12.18\\_PT.pdf](https://www.fundecitrus.com.br/pdf/Grade_de_Agrotoxicos_03.12.18_PT.pdf). Acesso em 28  
505 nov 2018
- 506 PIM (2018) Produção Integrada de Maçã – PIM. Grade de agrotóxicos e agroquímicos ciclo  
507 2018/2019. Disponível em [http://agapomi.com.br/wp-content/uploads/Grade-de-](http://agapomi.com.br/wp-content/uploads/Grade-de-Agroqu%C3%ADmicos-ciclo-2018-19-1.pdf)  
508 [Agroqu%C3%ADmicos-ciclo-2018-19-1.pdf](http://agapomi.com.br/wp-content/uploads/Grade-de-Agroqu%C3%ADmicos-ciclo-2018-19-1.pdf). Acesso em 28 nov 2018
- 509 Piovesan, B. (2018) Inventário de visitantes florais na cultura do morangueiro e efeitos de  
510 inseticidas sobre as abelhas nativas *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca fiebrigi*.  
511 Dissertation, Federal University of Pelotas
- 512 Roselino, A. C., Hrncir, M. (2012) Repeated unrewarded scent exposure influences the food  
513 choice of stingless bee foragers, *Melipona scutellaris*. Animal Behaviour, **83**(3), 755-762.
- 514 Sanchez-Bayo, F., Goka, K. (2016) Impacts of pesticides on honey bees, in: Chambo, E. D.  
515 (Eds.) Beekeeping and Bee Conservation-Advances in Research
- 516 Scott-Dupree, C. D., Conroy, L., & Harris, C. R. (2009) Impact of currently used or potentially  
517 useful insecticides for canola agroecosystems on *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae),

- 518 *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae), and *Osmia lignaria* (Hymenoptera:  
519 Megachilidae). *Journal of Economic Entomology*, **102**(1), 177-182
- 520 Shapira, M., Thompson, C. K., Soreq, H., Robinson, G. E. (2001) Changes in neuronal  
521 acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. *Journal of*  
522 *Molecular Neuroscience*, **17**(1), 1-12
- 523 Scheidler, A., Kaulen, P., Bru, G., Erber, J. (1990) Quantitative autoradiographic localization  
524 of [<sup>125</sup>I]  $\alpha$ -bungarotoxin binding sites in the honeybee brain. *Brain research*, **534**(1-2), 332-  
525 335
- 526 Siviter, H., Koricheva, J., Brown, M. J., Leadbeater, E. (2018) Quantifying the impact of  
527 pesticides on learning and memory in bees. *Journal of Applied Ecology*, **55**(6), 2812-2821
- 528 Slaa, E. J., Chaves, L. A. S., Malagodi-Braga, K. S., Hofstede, F. E. (2006) Stingless bees in  
529 applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* **37**, 293-315
- 530 Souza, T. F., Cintra, P., Malaspina, O., Bueno, O. C., Fernandes, J. B., Silva Almeida, S. S. M.  
531 (2006) Toxic effects of methanolic and dichloromethane extracts of flowers and peduncles of  
532 *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae: Mimosoideae) on *Apis mellifera* and  
533 *Scaptotrigona postica* workers. *Journal of apicultural research*, **45**(3), 112-116
- 534 Thany, S. H., Gauthier, M. (2005) Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid  
535 modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis*  
536 *mellifera*. *Brain research*, **1039**(1-2), 216-219
- 537 Thany, S. H., Bourdin, C. M., Graton, J., Laurent, A. D., Mathé-Allainmat, M., Lebreton, J., &  
538 Le Questel, J. Y. (2015) Similar comparative low and high doses of deltamethrin and  
539 acetamiprid differently impair the retrieval of the proboscis extension reflex in the forager  
540 honey bee (*Apis mellifera*). *Insects*, **6**(4), 805-814
- 541 Thompson, H. M.; Maus, C. (2007) The relevance of sublethal effects in honey bee testing for  
542 pesticide risk assessment. *Pest Manag Sci: formerly Pesticide Science*, **63**(11), 1058-1061

- 543 Toda, N. R., Song, J., Nieh, J. C. (2009) Bumblebees exhibit the memory spacing  
544 effect. *Naturwissenschaften*, **96**(10), 1185-1191
- 545 Tomé, H. V. V., Barbosa, W. F., Martins, G. F., Guedes, R. N. C. (2015) Spinosad in the native  
546 stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide.  
547 *Chemosphere*, **124**, 103-109
- 548 Tosi, S., Burgio, G., Nieh, J. C. (2017) A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam,  
549 impairs honey bee flight ability. *Scientific reports*, **7**(1), 1201-1208
- 550 Venturieri, G. C., Alves, D. A., Villas-Bôas, J. K., Carvalho, C. A., Menezes, C. (2011)  
551 *Meliponicultura no Brasil: Situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização*, In:  
552 Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Saraiva AM, *Polinizadores no Brasil: contribuição e*  
553 *perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais.*  
554 EDUSP, São Paulo
- 555 Williamson, S. M., Moffat, C., Gomersall, M., Saranzewa, N., Connolly, C., Wright, G. A.  
556 (2013) Exposure to acetylcholinesterase inhibitors alters the physiology and motor function of  
557 honeybees. *Frontiers in Physiology*, **4**, 13
- 558 Witter, S., Nunes-Silva, P. (2014) *Manual de boas práticas para o manejo e conservação de*  
559 *abelhas nativas (meliponíneos)*. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.
- 560 Witter, S., Nunes-Silva, P., Blochtein, B., Lisboa, B. B., Imperatriz-Fonseca, V. L. (2014) *As*  
561 *abelhas e a agricultura*. Porto Alegre: EDIPUCRS.

562 **Tabela 1.** Número médio ( $\pm$  EP) de respostas do reflexo da extensão da probóscide (REP) de *Plebeia emerina* à sacarose após a exposição via oral  
 563 de acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade 24 horas após a intoxicação.

Inseticidas	Número médio ( $\pm$ EP) de respostas							GL	H	P
	Água	Concentração de sacarose								
		10%	30%	50%	70%	80%				
Acetamiprido	CL <sub>10</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 B*b <sup>\$</sup>	15,00 $\pm$ 0,58 BCDA*	15,67 $\pm$ 0,67 CDA*	18,67 $\pm$ 0,67 EFGa <sup>#</sup>	19,00 $\pm$ 0,58 Ca*	19,00 $\pm$ 0,58 Ca*	5	14,68	0,01
	CL <sub>50</sub>	8,67 $\pm$ 0,88 Ac	14,00 $\pm$ 0,58 CDb	14,67 $\pm$ 0,33 Dab	17,00 $\pm$ 0,58 Gab	18,00 $\pm$ 0,58 Ca	18,33 $\pm$ 0,33 Ca	5	15,25	0,01
Malationa	CL <sub>10</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 Bb	20,67 $\pm$ 0,88 ABa	21,00 $\pm$ 0,58 BCa	21,33 $\pm$ 0,33 DEa	21,00 $\pm$ 0,00 BCa	21,00 $\pm$ 0,00 BCa	5	18,26	0,01
	CL <sub>50</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 Bb	15,00 $\pm$ 0,58 BCDA	16,00 $\pm$ 0,58 CDA	18,33 $\pm$ 0,33 FGA	20,67 $\pm$ 2,03 BCa	21,00 $\pm$ 1,15 BCa	5	14,83	0,01
Fosmete	CL <sub>10</sub>	12,00 $\pm$ 1,15 Ac	18,00 $\pm$ 1,73 BCbc	24,00 $\pm$ 1,15 ABab	24,00 $\pm$ 1,15 CDab	24,67 $\pm$ 0,33 ABa	24,33 $\pm$ 0,33 ABa	5	12,37	0,03
	CL <sub>50</sub>	7,00 $\pm$ 0,58 Ac	12,00 $\pm$ 1,16 Dbc	17,00 $\pm$ 1,58 BCDab	20,67 $\pm$ 0,33 Efa	21,00 $\pm$ 0,58 BCa	21,00 $\pm$ 0,58 BCa	5	14,98	0,01
Espinosaide	CL <sub>10</sub>	15,00 $\pm$ 1,15 Ac	21,00 $\pm$ 1,15 ABbc	24,00 $\pm$ 0,58 ABab	27,00 $\pm$ 0,58 ABa	24,00 $\pm$ 0,58 ABab	23,67 $\pm$ 0,33 ABab	5	14,34	0,01
	CL <sub>50</sub>	0,67 $\pm$ 0,33 Bc	14,67 $\pm$ 0,33 CDb	15,00 $\pm$ 1,15 Db	24,33 $\pm$ 0,33 BCa	20,00 $\pm$ 0,58 Cab	21,00 $\pm$ 0,58 BCab	5	15,91	0,01
Controle		0,00 $\pm$ 0,00 Bb	28,00 $\pm$ 0,58 Aa	29,67 $\pm$ 0,33 Aa	29,67 $\pm$ 0,33 Aa	29,67 $\pm$ 0,33 Aa	29,67 $\pm$ 0,33 Aa	5	12,20	0,03
GL		8	8	8	8	8	8			
F		--	--	--	54,00	--	--			
H		24,91	22,20	23,23	--	21,44	22,54			
P		0,0016	0,0046	0,0031	<0,0001	0,0060	0,0040			

564 \*O número médio de abelhas seguido da mesma letra maiúscula na coluna não diferiu significativamente usando o teste de Dunn ( $P < 0,05$ ). #O  
 565 número médio de abelhas seguido pela mesma letra maiúscula na coluna não diferiu significativamente usando o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). \$O  
 566 número médio de abelhas seguido da mesma letra minúscula na linha não diferiu significativamente usando o teste de Dunn ( $P < 0,05$ ).  
 567

568 **Tabela 2.** Número médio ( $\pm$  EP) de respostas do reflexo da extensão da probóscide (REP) de *Tetragonisca fiebrigi* à sacarose após a exposição via  
 569 oral de acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade 24 horas após a intoxicação.

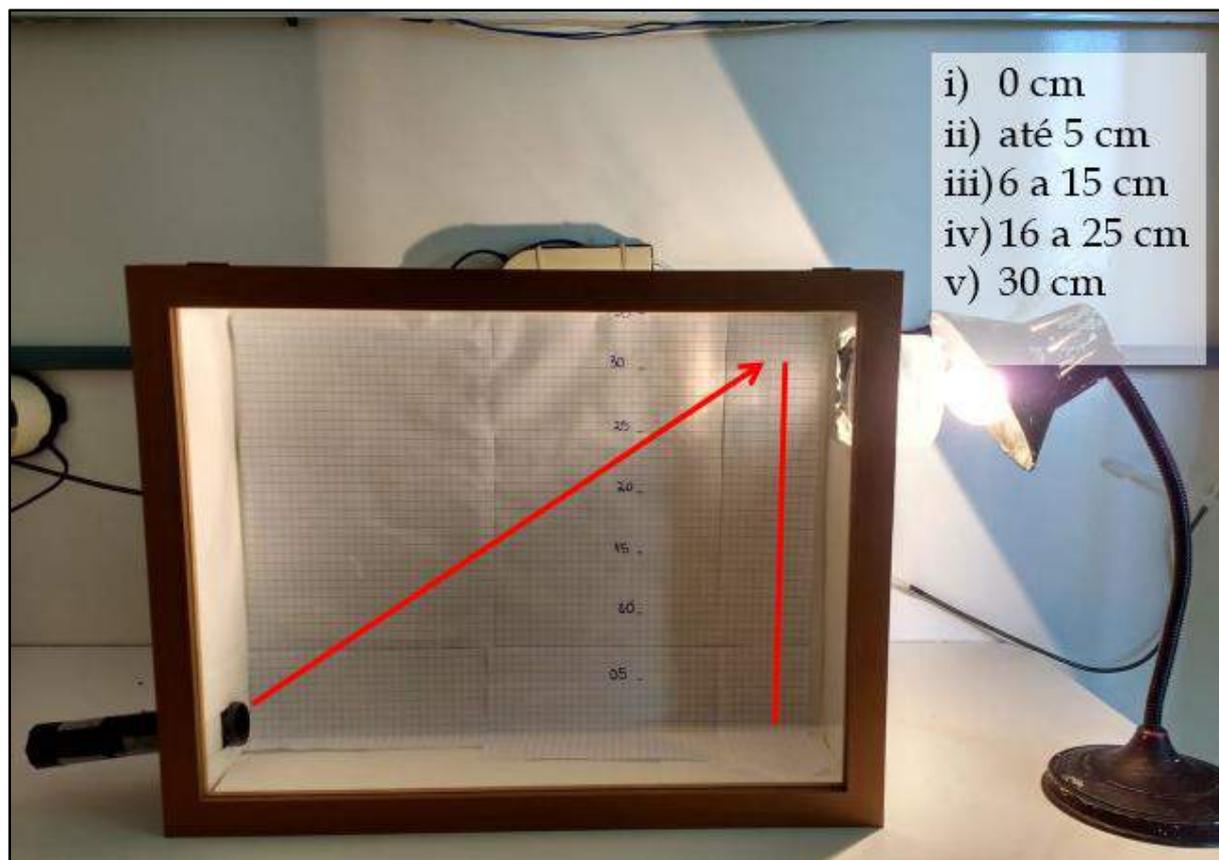
Inseticidas	Número médio ( $\pm$ EP) de respostas						GL	H	P	
	Água	Concentração de sacarose								
		10%	30%	50%	70%	80%				
Acetamiprido	CL <sub>10</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 B*c <sup>\$</sup>	6,00 $\pm$ 0,58 D#b	14,67 $\pm$ 0,33 C#ab	15,00 $\pm$ 0,58 CD#a	15,33 $\pm$ 0,33 CD#a	15,67 $\pm$ 0,67 CD#a	5	13,49	0,02
	CL <sub>50</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 Bc	8,67 $\pm$ 0,88 Cb	9,00 $\pm$ 0,58 Dab	9,33 $\pm$ 0,88 Eab	12,00 $\pm$ 1,15 Da	12,00 $\pm$ 0,58 Da	5	13,26	0,02
Malationa	CL <sub>10</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 Bc	0,00 $\pm$ 0,00 Ec	1,33 $\pm$ 0,33 Eb	12,00 $\pm$ 0,58 CDa	18,00 $\pm$ 0,58 BCa	18,33 $\pm$ 0,33 BCa	5	16,34	0,01
	CL <sub>50</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 Bc	0,00 $\pm$ 0,00 Ec	0,00 $\pm$ 0,00 Ec	9,00 $\pm$ 0,58 Eb	18,00 $\pm$ 0,58 BCa	18,33 $\pm$ 0,33 BCa	5	16,34	0,01
Fosmete	CL <sub>10</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 Bc	6,00 $\pm$ 0,58 Db	21,00 $\pm$ 0,58 Ba	21,00 $\pm$ 1,15 Ba	21,67 $\pm$ 0,67 Ba	21,67 $\pm$ 1,20 Ba	5	12,38	0,01
	CL <sub>50</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 Bc	9,33 $\pm$ 0,33 Cb	12,00 $\pm$ 1,15 CDab	15,00 $\pm$ 0,58 CDa	15,33 $\pm$ 0,88 CDa	15,33 $\pm$ 1,45 CDa	5	13,99	0,01
Espinosaide	CL <sub>10</sub>	8,33 $\pm$ 0,67 Abc	12,33 $\pm$ 0,33 Bb	15,00 $\pm$ 0,58 Cab	18,00 $\pm$ 0,58 BCa	18,33 $\pm$ 0,33 BCa	18,33 $\pm$ 0,33 BCa	5	13,28	0,01
	CL <sub>50</sub>	9,00 $\pm$ 0,58 Ab	9,33 $\pm$ 0,33 Cb	9,67 $\pm$ 0,33 Db	17,67 $\pm$ 0,33 BCa	18,67 $\pm$ 0,67 BCa	18,67 $\pm$ 1,20 BCa	5	13,87	0,02
Controle		0,00 $\pm$ 0,00 Bc	16,00 $\pm$ 0,58 Ab	25,00 $\pm$ 1,15 Aa	27,00 $\pm$ 0,58 Aa	27,00 $\pm$ 1,15 Aa	27,00 $\pm$ 0,58 Aa	5	13,20	0,02
GL		8	8	8	8	8	8			
F		--	117,60	151,40	70,40	31,15	24,88			
H		25,58	--	--	--	--	--			
P		0,0012	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001			

570 \*O número médio de abelhas seguido da mesma letra maiúscula na coluna não diferiu significativamente usando o teste de Dunn ( $P < 0,05$ ). #O  
 571 número médio de abelhas seguido pela mesma letra maiúscula na coluna não diferiu significativamente usando o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). \$O  
 572 número médio de abelhas seguido da mesma letra minúscula na linha não diferiu significativamente usando o teste de Dunn ( $P < 0,05$ ).



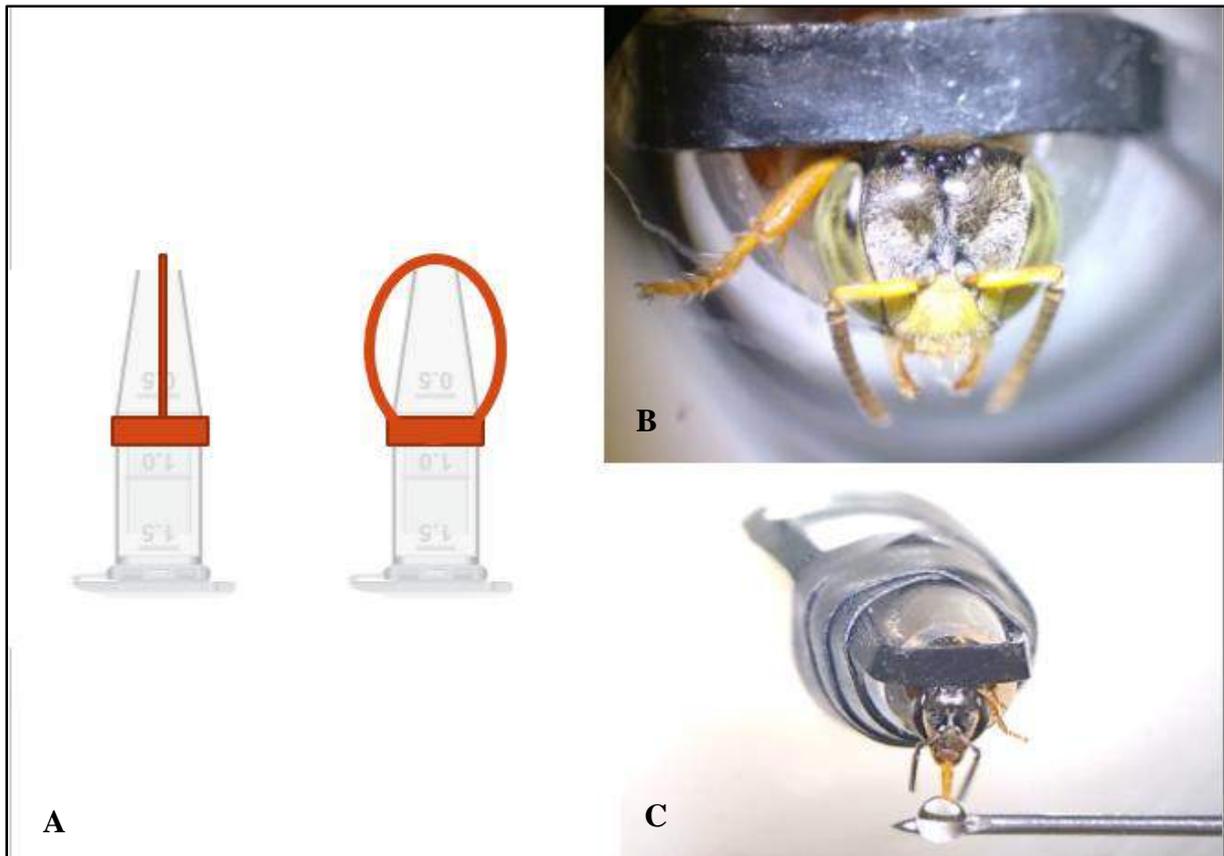
573

574 **Figura 1.** Túnel de atividade locomotora. Tubo de silicone acoplado a um aparelho constituído  
575 por uma placa de madeira – detalhe do percurso de 50cm que era utilizado para avaliar a  
576 atividade locomotora das abelhas (ângulo utilizado nos experimentos: 0 °).



577

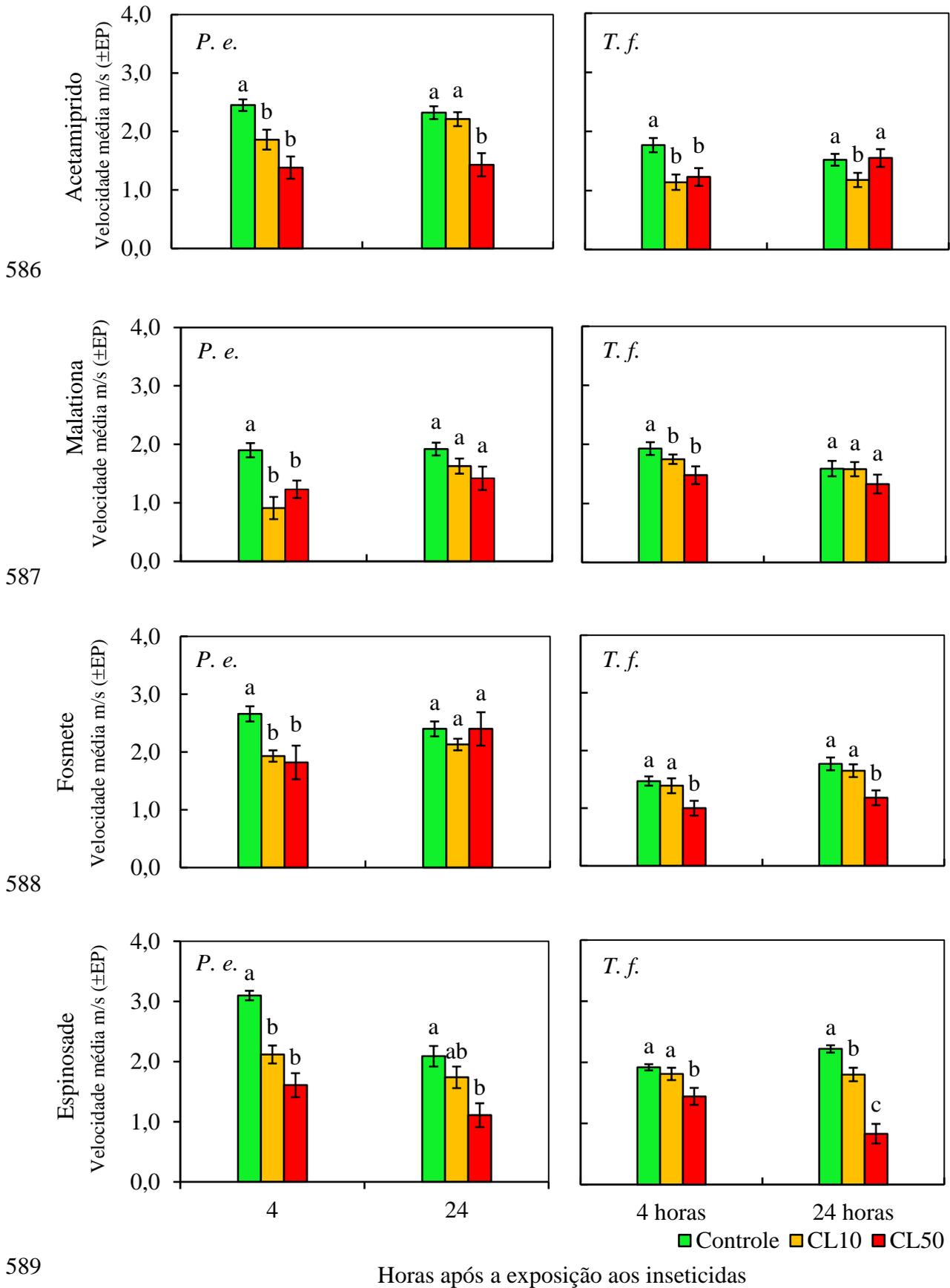
578 **Figura 2.** Caixa de madeira com tampa de vidro para avaliação da atividade de voo (decolagem)  
579 das abelhas. As setas vermelhas indicam a altura de voo avaliada.

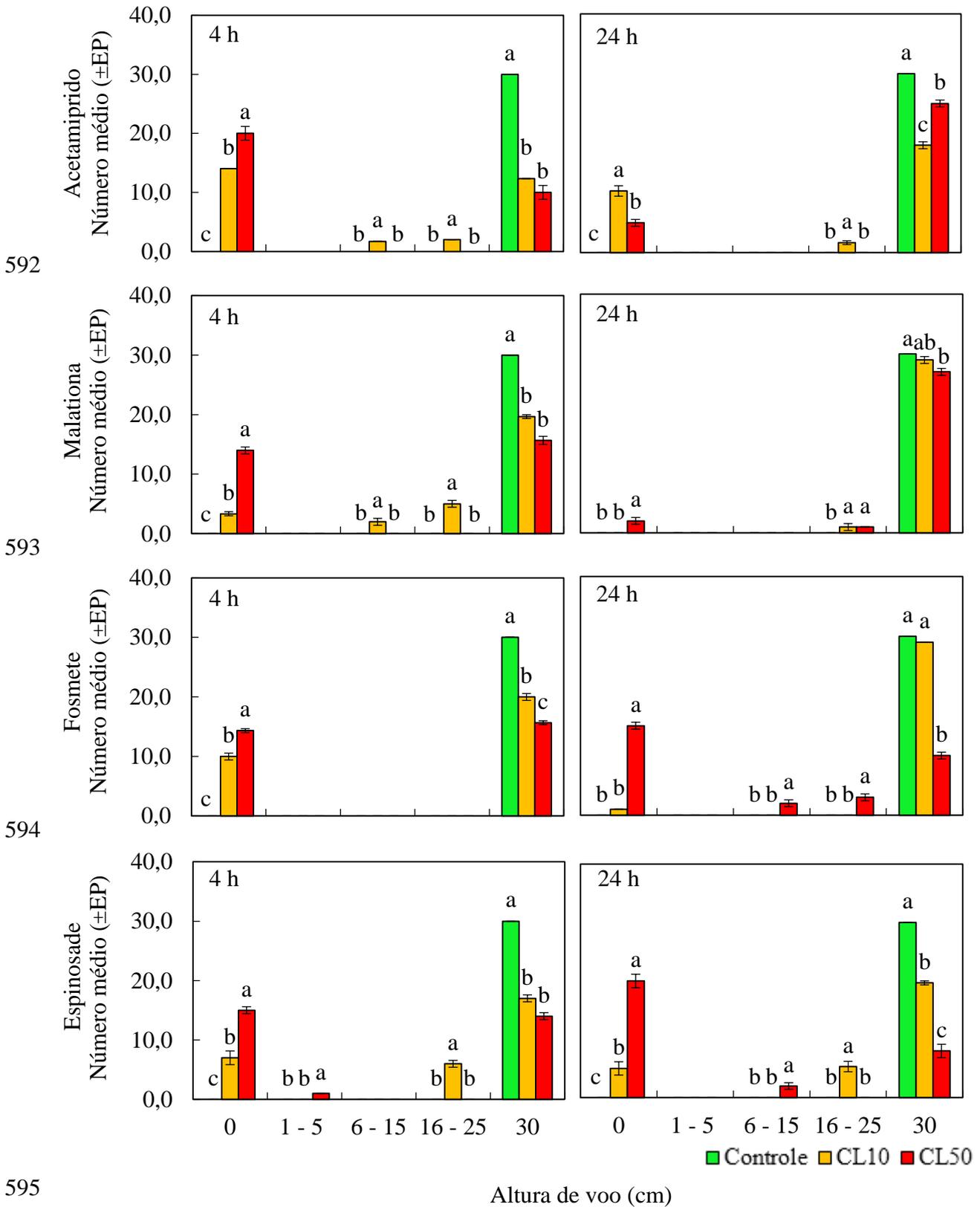


580

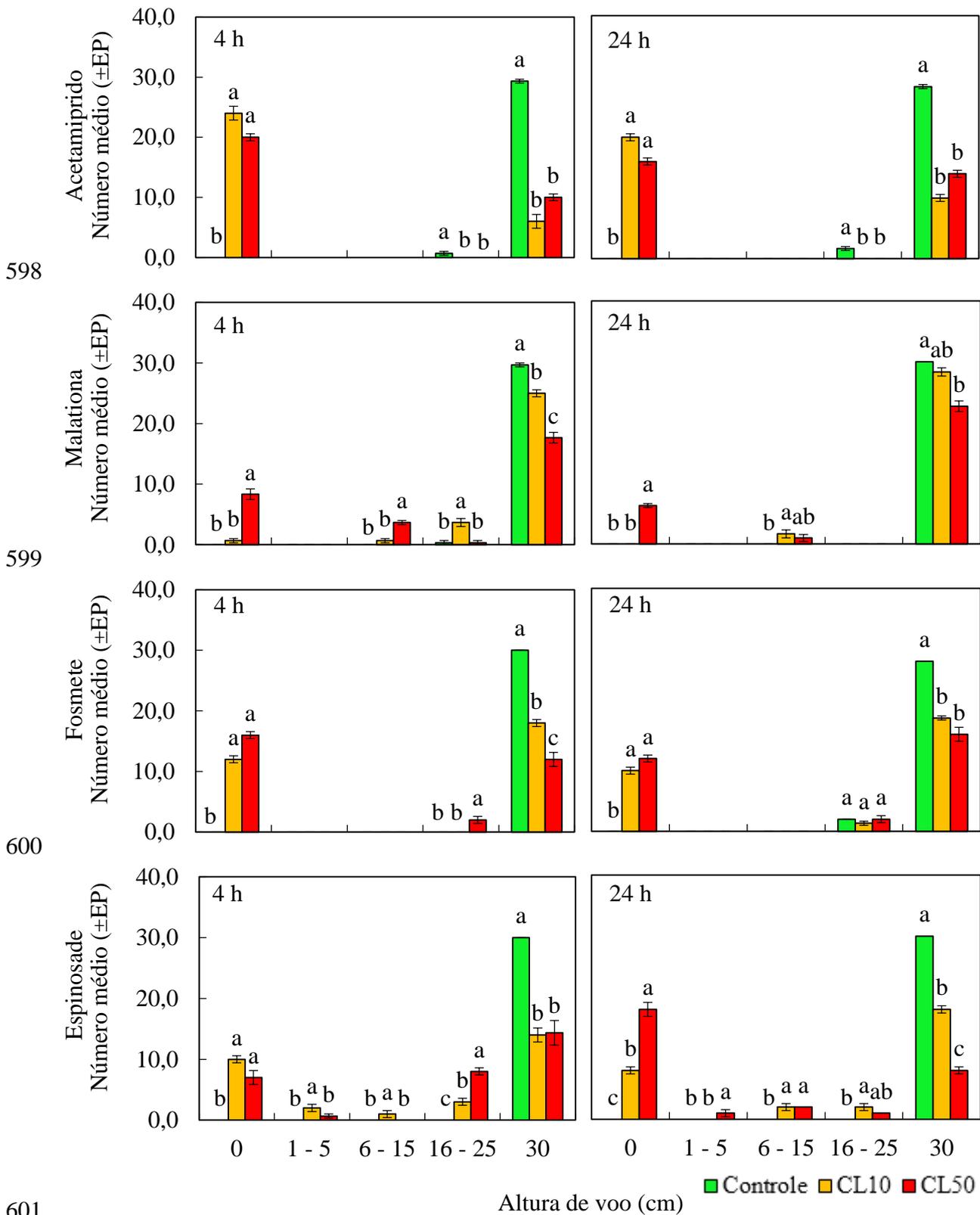
581 **Figura 3.** (A) Desenho das cápsulas plásticas confeccionadas a partir de tubos Eppendorf® para  
582 acondicionar as abelhas no experimento de Reflexo de Extensão da Probóscide. (B) Operária  
583 de *Tetragonisca fiebrigi* na cápsula presa por uma tira de silicone. (C) Operária de *Plebeia*  
584 *emerina* com a probóscide estendida em direção ao alimento.

585





**Figura 5.** Atividade de voo (decolagem) de forrageiras de *Plebeia emerina* 4 e 24 horas após exposição oral aos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade.



**Figura 6.** Atividade de voo (decolagem) de forrageiras de *Tetragonisca fiebrigi* 4 e 24 horas após exposição oral aos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade.

#### **4. Artigo 3 - Ecotoxicology and Environmental Safety**

Versão em português

**Toxicidade, atratividade e repelência de iscas tóxicas às abelhas sem ferrão  
*Plebeia emerina* (Friese) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera:  
Apidae: Meliponini)**

Aline Costa Padilha, Bruna Piovesan, Máira Chagas Morais, Cristiano João Arioli,  
Moises João Zotti, Anderson Dionei Grützmacher, Marcos Botton

1 Toxicidade, atratividade e repelência de iscas tóxicas às abelhas sem ferrão *Plebeia emerina*  
2 (Friese) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)

3

4 Aline Costa Padilha<sup>a\*</sup>, Bruna Piovesan<sup>a</sup>, Máira Chagas Morais<sup>a</sup>, Cristiano João Arioli<sup>b</sup>,  
5 Moises João Zotti<sup>a</sup>, Anderson Dionei Grützmacher<sup>a</sup>, Marcos Botton<sup>c</sup>

6

7

8 <sup>a</sup>Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM),  
9 Departamento de Fitossanidade (DFs). Campus Universitário, Capão do Leão, RS, 96010-  
10 610, Brasil

11 <sup>b</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural (EPAGRI). Rua Araújo  
12 Lima, 102, São Joaquim, SC, 88600-000, Brasil

13 <sup>c</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Embrapa Uva e Vinho. Rua  
14 Livramento, 515, Bento Gonçalves, RS, 95700-000, Brasil.

15

16 \*Autor para correspondência. Endereço: Universidade Federal de Pelotas, Departamento de  
17 Fitossanidade, Avenida Eliseu Maciel, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Capão-do-Leão,  
18 RS, Brasil, tel: +55 53 3275 7376 ou +55 53 9940 2888, fax: +55 53 3275 9031, e-mail:

19 acostapadilha08@gmail.com

20

21

22

23

24

25 **Resumo** – Formulações de iscas tóxicas tem sido uma das principais estratégias utilizadas nos  
26 pomares de macieira no sul do Brasil para o controle da mosca-das-frutas sul-americana.  
27 Entretanto, seus efeitos sobre as abelhas nativas *Plebeia emerina* (Friese) e *Tetragonisca*  
28 *fiebrigi* (Schwarz) não são conhecidos. Este trabalho teve como objetivo conhecer a toxicidade,  
29 atratividade e repelência de atrativos alimentares e iscas tóxicas sobre *P. emerina* e *T. fiebrigi*.  
30 Avaliaram-se os atrativos Anamed<sup>®</sup> puro, Biofruit<sup>®</sup> (3%), Flyral<sup>®</sup> (1,25%), Melaço de cana-de-  
31 açúcar (7%) e Samaritá Tradicional<sup>®</sup> (3%), em formulações de iscas tóxicas associados aos  
32 inseticidas Tracer 480 SC<sup>®</sup> (espinosade) e Malathion 1000 EC<sup>®</sup> (malationa), e as iscas tóxicas  
33 de pronto uso Success<sup>®</sup> 0,02CB e Gelsura<sup>®</sup>. Obteve-se a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) e a  
34 sobrevivência média das operárias após a exposição às formulações de iscas tóxicas. No campo,  
35 foram realizados testes de atratividade e repelência das iscas tóxicas sobre o forrageamento das  
36 operárias. Os atrativos alimentares associados a malationa e espinosade apresentaram diferentes  
37 níveis de toxicidade para *P. emerina* e *T. fiebrigi*, em função do atrativo alimentar. Melaço de  
38 cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup> associados ao espinosade apresentaram elevada  
39 toxicidade com valores de CL<sub>50</sub> de 6,92 e 10,61 ng/μL de dieta para *P. emerina* e 4,37 e 15,48  
40 ng/μL de dieta para *T. fiebrigi*, respectivamente. Gelsura<sup>®</sup> e os atrativos associados à malationa  
41 ocasionaram rápida mortalidade das abelhas, sendo a sobrevivência média inferior à 3 horas  
42 após a exposição. Nenhuma formulação de isca tóxica foi atrativa para forrageiras de *P. emerina*  
43 no campo. Anamed<sup>®</sup>, Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup> foram repelentes ao forrageio de *P. emerina*.

44

45 **Palavras-chave:** *Malus domestica*, *Anastrepha fraterculus*, atrativos alimentares, atraí e mata,  
46 polinizadores, abelhas nativas

## 47 1. Introdução

48 A macieira é uma das principais frutíferas de clima temperado cultivadas no Brasil. A  
49 cultura possui alta dependência da polinização cruzada para que seja obtida produção comercial

50 satisfatória, pois apresenta muitas cultivares com alto grau de incompatibilidade (Klein et al.,  
51 2007). Assim, a sincronia de floração entre diferentes cultivares e a intensa atividade de  
52 polinizadores são fundamentais para que se tenha uma polinização eficaz e uma fertilização  
53 bem sucedida (Broothaerts et al., 2004; Petri et al., 2008).

54 Os polinizadores determinam a quantidade da produção, bem como a qualidade de  
55 maçãs, onde frutos bem polinizados apresentam maior peso e/ou teor de açúcar, por exemplo  
56 (Garratt et al. 2014; Geslin et al. 2017; Sapir et al., 2017). As abelhas são os principais agentes  
57 polinizadores das flores de macieira, com destaque para *Apis mellífera* Linnaeus (Hymenoptera:  
58 Apidae) (Nunes-Silva et al., 2016). Além da abelha melífera, insetos silvestres, tais como  
59 abelhas sem ferrão, abelhas solitárias e dípteros, também são visitantes florais de macieira. A  
60 abundância e a diversidade desses polinizadores silvestres afetam positivamente o rendimento  
61 da cultura (Viana et al., 2014; Martins et al., 2015; Blitzer et al. 2016; Nunes-Silva et al., 2016).

62 As abelhas sem ferrão *Plebeia emerina* (Friese) e *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz)  
63 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) são consideradas espécies rústicas, resistentes à baixas  
64 temperaturas e de fácil manejo, amplamente encontradas na região sul do Brasil, local onde se  
65 concentra aproximadamente 99% da produção de maçãs do país (Nogueira-Neto, 1997;  
66 Camargo; Pedro 2013; IBGE, 2018). Além disso, *P. emerina*, conhecida popularmente como  
67 “mirim emerina”, destaca-se como visitante floral e polinizadora eficiente da macieira, podendo  
68 ser utilizada como agente complementar à abelha melífera na polinização da cultura (Orth,  
69 1984; Ortolan; Laroca, 1996).

70 Ademais, devido à ausência de ferrão funcional, baixa agressividade e menor tamanho  
71 populacional das colônias, as abelhas sem ferrão *P. emerina* e *T. fiebrigi* são adequadas para a  
72 polinização de culturas agrícolas em áreas povoadas ou que necessitam de tratamentos culturais  
73 durante a floração (Slaa et al., 2006; Jaffé et al., 2015). *P. emerina* e *T. fiebrigi* constroem seus

74 ninhos na floresta nativa, em cavidades pré-existentes nos troncos de árvores de espécies  
75 silvestres, podendo estar localizados nas bordas dos pomares (Roubik 2006; Michener 2013).

76 Para que a produção de frutos nos pomares seja satisfatória, além da polinização  
77 eficiente, são necessários diversos tratamentos culturais, principalmente no que se refere ao controle  
78 de insetos-praga como a mosca-das-frutas sul-americana, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann)  
79 (Diptera: Tephritidae), principal praga da cultura no sul do Brasil (Nora; Hickel, 2006). O  
80 controle de adultos e larvas de *A. fraterculus* foi realizado com sucesso, durante muitos anos,  
81 por meio de inseticidas do grupo químico Organofosforado pulverizados em cobertura (Härter  
82 et al., 2015). Todavia, este grupo químico caracteriza-se por apresentar elevada toxicidade e  
83 período de carência, além de baixa seletividade aos inimigos naturais e insetos polinizadores  
84 (Devillers, 2003; Botton et al., 2016; Castilhos et al., 2013; 2017).

85 Dentre os métodos de controle preconizados pelo Manejo Integrado de Pragas (MIP)  
86 para o controle da mosca-das-frutas o emprego de iscas tóxicas tem sido a principal alternativa  
87 ao uso de inseticidas aplicados em cobertura (Stark et al., 2004; Chueca et al., 2007; Ruiz et al.,  
88 2008; Borges et al., 2015). A isca tóxica pode ser formulada misturando um atrativo alimentar  
89 com um agente letal (inseticida) ou com formulações de pronto uso, como o Success<sup>®</sup> 0,02 CB  
90 (Borges et al., 2015; Härter et al., 2015).

91 O melaço de cana-de-açúcar tem sido o principal atrativo alimentar usado para formular  
92 iscas tóxicas no sul do Brasil (Härter et al., 2010), pois os açúcares atuam como  
93 fagoestimulantes, aumentando a quantidade de isca ingerida pelos insetos adultos (Nestel et al.,  
94 2004). As proteínas hidrolisadas são outra fonte alimentar que pode ser empregada como  
95 atrativo em iscas tóxicas para o controle de *A. fraterculus*. No Brasil, destacam-se formulações  
96 comerciais Biofruit<sup>®</sup>, Samaritá Tradicional<sup>®</sup> e Flyral<sup>®</sup> (Botton et al., 2016). Um novo atrativo  
97 alimentar, Anamed<sup>®</sup> composto de atrativos de origem vegetal, açúcares fagoestimulantes,

98 emulsão inerte de óleos e ceras, também tem sido utilizado para o controle de moscas-das-frutas  
99 principalmente na cultura da macieira (Borges et al. 2015).

100 A aplicação das iscas tóxicas geralmente ocorre nas primeiras horas da manhã, com  
101 auxílio de pulverizador calibrado para depositar gotas grossas dirigidas às folhas ou troncos das  
102 árvores, em fileiras do interior e borda do pomar, especialmente na divisa com matas nativas  
103 (Nava; Botton, 2011; Botton et al., 2016). Visto que as abelhas normalmente iniciam suas  
104 atividades de forrageamento logo nos primeiros raios solares, coletando tanto néctar, água,  
105 pólen, quanto resina e barro (Souza et al., 2006; Oliveira et al., 2012), as gotas grossas, que se  
106 destacam na paisagem pela sua cor e forma, logo após a pulverização, podem atrair as abelhas  
107 que estão em busca desses recursos e por serem fontes de açúcares e proteínas, as quais são  
108 base da alimentação da colmeia.

109 Não existem trabalhos que estudem a toxicidade, atratividade e repelência de  
110 formulações de iscas tóxicas em abelhas sem ferrão brasileiras. Dessa forma, este trabalho teve  
111 como objetivo conhecer a toxicidade, atratividade e repelência dos atrativos alimentares  
112 Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, Samaritá Tradicional<sup>®</sup> e melação de cana-de-açúcar em  
113 formulações de iscas tóxicas associados aos inseticidas malationa e espinosade e das iscas  
114 tóxicas de pronto uso Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup> 0,02CB sobre *P. emerina* e *T. fiebrigi*.

115

## 116 **2. Material e Métodos**

### 117 2.1. Insetos

118 Foram utilizadas operárias adultas de *P. emerina* e *T. fiebrigi*, criadas no meliponário  
119 experimental da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas  
120 (UFPel) (cadastro SisGen A7B64FD). Para a coleta, foram verificadas as condições de saúde e  
121 o estado fisiológico das abelhas, de acordo com as diretrizes para testes químicos em abelhas  
122 (OECD, 1998). Foram coletadas abelhas de três colmeias distintas não parentais (para garantir

123 a variabilidade genética), em dias ensolarados com temperatura acima de 18°C. As operárias de  
124 *P. emerina* e *T. fiebrigi*, que se localizavam na parte superior da colmeia, foram coletadas em  
125 grupos através de sugador entomológico e pinça, respectivamente.

126 As abelhas coletadas foram acondicionadas em gaiolas compostas por potes plásticos  
127 transparentes com capacidade de 250 mL (diâmetro interno: 90 x 60 mm; diâmetro externo:  
128 105 x 65 mm). Para a manutenção das abelhas, a gaiola teve o fundo do pote forrado com papel  
129 filtro e na parte superior acoplado um tubo Eppendorf® (1,5 mL) para a oferta do alimento.  
130 Após a coleta, as abelhas foram levadas ao laboratório de Manejo Integrado de Pragas  
131 (LabMIP/UFPel) e mantidas em salas climatizadas (temperatura: 28±1 °C; UR: 70±2%;  
132 escotofase de 24 horas). A fim de minimizar o estresse ocasionado pelo confinamento,  
133 previamente ao início dos testes, as abelhas permaneceram em adaptação por 24 horas, sendo  
134 alimentadas com solução de sacarose (50% v/v).

## 135 2.2. Iscas tóxicas

136 Cinco atrativos alimentares foram avaliados: i) Anamed® (Isca Tecnologias, Ijuí, RS,  
137 Brasil), atrativo de origem vegetal, açúcares fagoestimulantes, emulsão inerte de óleos e ceras;  
138 ii) Biofruit® a 3% (BioControle Métodos de Controle de Pragas Ltda., Indaiatuba, SP, Brasil),  
139 proteína hidrolisada de milho; iii) Flyral® a 1,25% (BioIbérica S.A., Barcelona, Espanha),  
140 proteína hidrolisada enzimática de origem animal; iv) Samaritá Tradicional® a 3% (Samarita  
141 Indústria e Comércio Ltda., Artur Nogueira, SP, Brasil), proteína vegetal, açúcares redutores e  
142 conservantes e v) melão de cana-de-açúcar a 7%. As concentrações dos atrativos alimentares  
143 utilizadas foram definidas através da recomendação dos fabricantes e/ou pela experiência  
144 prática de uso.

145 Para a formulação das iscas tóxicas, os atrativos alimentares foram misturados aos  
146 inseticidas Tracer 480 SC® (espinosade 480 g i.a./L p.c.) (Dow AgroSciences Industrial Ltda.,  
147 São Paulo, SP, Brasil) e Malathion 1000 EC® (malationa 1000 g i.a./L p.c.) (FMC Química do

148 Brasil Ltda., Campinas, SP, Brasil). Nos experimentos de sobrevivência, atratividade e  
149 repelência, foram utilizadas as iscas de pronto uso Success 0,02CB<sup>®</sup> (0,24 g/L) (Dow  
150 AgroSciences Industrial Ltda., São Paulo, SP, Brasil) diluído em água na proporção de uma  
151 parte de produto comercial para 1,5 partes de água conforme recomendação, obtendo-se a  
152 concentração de 96 mg.L<sup>-1</sup> e Gelsura<sup>®</sup> (BASF S/A, São Paulo, SP, Brasil) diluído nas  
153 proporções de uma parte do produto para duas de água resultando em mistura contendo 0,2%  
154 de alfa-cipermetrina.

### 155 2.3. Bioensaio de toxicidade letal aguda – Via oral

156 A suscetibilidade das abelhas operárias às formulações de iscas tóxicas foi avaliada  
157 mediante exposição via oral. As concentrações para cada inseticida (malationa e espinosade)  
158 foram determinadas através de bioensaios realizados em duas etapas: i) testes preliminares:  
159 realizaram-se com o objetivo de reconhecer a faixa de concentração que apresentaram variação  
160 de resposta. Estabeleceu-se uma concentração estoque (CE) de 1000 ng i.a./μL de dieta. Através  
161 de diluições em série (1:10) da CE em água destilada, foram obtidas seis concentrações em  
162 ordem decrescente para o reconhecimento da faixa de concentrações para ocasionar mortalidade  
163 entre 0 a 100% para serem utilizadas nos testes definitivos; ii) testes definitivos: reconhecida a  
164 faixa de resposta dos testes preliminares, a CE dos inseticidas foi diluída em água destilada para  
165 o estabelecimento de sete a nove doses em concentrações crescentes de seus ingredientes ativos  
166 a serem aplicados.

167 As formulações dos inseticidas diluídas em água destilada, nas diferentes concentrações,  
168 foram adicionadas aos atrativos alimentares: Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, Samatirá  
169 Tradicional<sup>®</sup> e melão de cana-de-açúcar em suas devidas concentrações e acondicionadas em  
170 tubos Eppendorf<sup>®</sup> com um orifício no fundo de forma que as abelhas tivessem acesso ao  
171 alimento contaminado. As seguintes concentrações mínima e máxima (em ng i.a./μL) foram

172 usadas nos testes: espinosade (Tracer<sup>®</sup>) 2,0 a 100,0 e malationa (Malathion<sup>®</sup> 1000 EC) 1,0 a  
173 500,0.

174 Para induzir o consumo do alimento oferecido às abelhas, os indivíduos foram privados  
175 de alimentação por um período de duas horas antes do início dos experimentos. Após o período  
176 de jejum, cada grupo de abelhas recebeu 1,0 mL de alimento contaminado e o controle 1,0 mL  
177 de alimento sem inseticida. Após seis horas de oferta de alimento contaminado, o alimentador  
178 foi substituído por um novo, contendo apenas solução de sacarose *ad libitum*. A quantidade de  
179 alimento consumida pelo grupo de abelhas foi obtida através da pesagem do alimentador antes  
180 e após a exposição.

181 Para cada tratamento (concentração de inseticida) foram utilizadas seis repetições, cada  
182 uma contendo dez abelhas adultas de três diferentes colônias para cada espécie avaliada,  
183 totalizando 60 abelhas por tratamento. As gaiolas foram mantidas em sala climatizada  
184 (Temperatura: 28°C ± 1°C; Umidade Relativa: 70% ± 2%; Escotofase de 24 horas). As taxas  
185 de mortalidade foram observadas 48 horas após a oferta do alimento contaminado.

### 186 2.3.2. Tempo médio de sobrevivência

187 A sobrevivência das abelhas após a exposição das formulações de iscas tóxicas via oral,  
188 foi avaliada. Os inseticidas malationa na concentração de 2000 mg.L<sup>-1</sup> de dieta e espinosade na  
189 concentração de 96 mg.L<sup>-1</sup> de dieta foram adicionados aos atrativos alimentares Anamed<sup>®</sup>,  
190 Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, Melão de cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup>, nas suas respectivas  
191 concentrações. Além disso, foram utilizadas duas iscas de pronto uso Success<sup>®</sup> 0,02CB (0,24  
192 g/L) diluído em água na proporção de uma parte de produto comercial para 1,5 partes de água,  
193 conforme recomendação, obtendo-se a concentração de 96 mg.L<sup>-1</sup> e Gelsura<sup>®</sup> diluído na  
194 proporção de uma parte do produto para duas de água, resultando em mistura contendo 0,2%  
195 de alfa-cipermetrina. A exposição dos inseticidas para as abelhas e o delineamento experimental  
196 foram realizados de acordo com o descrito anteriormente para os bioensaios de toxicidade oral.

197 As avaliações de mortalidade ocorreram 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 12,0; 24,0;  
198 48,0; 72,0 e 96,0 horas após a exposição aos inseticidas.

#### 199 2.4. Bioensaios de campo

200 Os experimentos de campo foram realizados nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro  
201 de 2017 e 2018, em período de crescimento dos frutos e que as aplicações de iscas tóxicas são  
202 mais comuns no Brasil. Estações artificiais de forrageamento foram instaladas a 10 m do  
203 meliponário experimental (Figura 1A). As operárias passaram por um treinamento durante dois  
204 dias para reconhecimento do local. Primeiramente, as operárias foram treinadas a coletarem  
205 xarope (sacarose, 50% v/v) em alimentador artificial, adaptando a metodologia proposta por  
206 von Frisch (1967) e Kaehler (2017). O alimentador consistiu de uma placa de acrílico com  
207 ranhuras de 2,0 mm de profundidade (Figura 1B), conectado ao recipiente contendo o xarope.  
208 O treinamento foi realizado em torno das 8:00 horas da manhã, com duração de quatro horas.  
209 No dia subsequente ao treinamento, o experimento foi instalado no mesmo horário. Novamente,  
210 foram oferecidos os alimentadores artificiais com solução de açúcar, precedendo o início dos  
211 ensaios.

212 A partir do momento que foi constatada a presença de no mínimo 25 abelhas por estação,  
213 os alimentadores artificiais de treinamento foram retirados, sendo iniciados os experimentos  
214 (Figura 1C). O delineamento experimental em blocos ao acaso com dez repetições foi utilizado  
215 para os testes de atratividade e repelência. Cada bloco consistiu em três estações de avaliação  
216 para formulações preparadas no campo: i) Controle (Figuras 2A e 3A), ii) Atrativo sem  
217 inseticida (Figuras 2B, 3B e 3C) e iii) Atrativo + inseticida (Figura 2C). Para as iscas de pronto  
218 uso foram utilizadas duas estações: ii) Isca tóxica e ii) Controle.

219 O número de forrageiras de *P. emerina* visitando as estações foi registrado a cada 10  
220 minutos através de fotografias, totalizando dez tomadas diárias de imagens para cada  
221 tratamento, as quais corresponderam às repetições. Os experimentos foram repetidos durante

222 dez dias favoráveis ao forrageamento das abelhas (dias ensolarados e com temperatura acima  
223 de 18°C). Posteriormente, o número de abelhas nas imagens foi contado em cada intervalo e  
224 tratamento. Após cada tomada de imagem, as unidades experimentais, bem como os blocos  
225 foram rotacionados para evitar memorização e recrutamento em estações específicas e para que  
226 todas as estações tivessem a mesma probabilidade de serem visitadas.

#### 227 2.4.1. Atratividade

228 Nos testes de atratividade, cada estação foi composta por uma placa de Petri com 90  
229 mm de diâmetro e 15 mm de altura, servindo de suporte para a placa de aplicação (Figura 2). A  
230 placa de aplicação constituiu de um círculo de papel filtro de 63,61 cm<sup>2</sup>. Sobre o papel filtro  
231 foram colocadas tiras de tecido absorvente (TNT), com área de 8,0 x 1,0 x 0,3 cm (Figura 2).  
232 Em cada tira foi aplicado, com uma microseringa graduada, 1,0 mL de cada tratamento  
233 avaliado, no tratamento controle foi utilizada uma solução de sacarose (50% v/v). Baldes  
234 plásticos de 45 cm de altura foram utilizados como suporte às estações de forrageamento  
235 (Figura 1), conforme metodologia adaptada de Ingram (2013) e Rosa (2016). Avaliou-se o  
236 efeito atrativo de atrativos alimentares com e sem inseticida e formulações de iscas tóxicas de  
237 pronto uso sobre o forrageamento das abelhas.

#### 238 2.4.2. Repelência

239 Nos testes de repelência, cada estação foi composta por uma placa de Petri com 90 mm  
240 de diâmetro e 15 mm de altura, servindo de suporte para a placa de aplicação (Figura 3). A  
241 placa de aplicação consistiu de um círculo papel filtro de 63,61 cm<sup>2</sup>. Baldes plásticos de 45 cm  
242 de altura foram utilizados como suporte às estações de forrageamento (Figura 1), conforme  
243 metodologia adaptada de Ingram (2013) e Rosa (2016).

244 As iscas tóxicas foram aplicadas sobre o papel filtro através de micropipeta simulando  
245 uma aplicação no campo, com gotas de 40 microlitros, entre 4 a 5 mm de diâmetro, distanciadas  
246 em, aproximadamente, 1,5 cm entre si. Para a aplicação do atrativo Anamed<sup>®</sup> (de consistência

247 pastosa) e das iscas tóxicas Success<sup>®</sup> e Gelsura<sup>®</sup> foi utilizada uma microseringa graduada. No  
248 tratamento controle foi aplicada água destilada. Com o objetivo de atrair as abelhas até as  
249 estações artificiais contendo as iscas tóxicas e/ou ingredientes da formulação, depositou-se, no  
250 centro da placa, um círculo de TNT com 2,7 cm de diâmetro, contendo em seu interior solução  
251 de sacarose 50% (Figura 3). Avaliou-se o efeito repelente de componentes e/ou formulações  
252 de iscas tóxicas sobre o forrageamento de sacarose 50%, que se mostrou o elemento mais  
253 atrativo à *P. emerina* após testes preliminares.

## 254 2.5. Análises estatísticas

255 A normalidade e homocedasticidade das variâncias dos dados de mortalidade e consumo  
256 de alimento foram verificadas através do teste de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Para  
257 comparar se houve diferença no consumo do alimento tratado com inseticida, durante a  
258 exposição por via oral, utilizou-se ANOVA com Tukey *post hoc* ( $P < 0,05$ ), através do  
259 programa R<sup>®</sup> (R Development Core Team, 2015).

260 Os valores de CL<sub>50</sub>, bem como o seu respectivo intervalo de confiança de 95% e valores  
261 qui-quadrado foram determinados empregando-se a função log-logistic do pacote “drc” –  
262 Analysis of Dose-Response Curves compilado pelo programa R<sup>®</sup> (R Development Core Team,  
263 2015) (Ritz; Streibig, 2005). Após a obtenção da CL<sub>50</sub> das iscas tóxicas, foi possível avaliar a  
264 toxicidade dos compostos comparando os valores de CL<sub>50</sub> entre cada composto para *P. emerina*  
265 e *T. fiebrigi*. Para tanto, foram utilizados os valores dos intervalos de confiança de CL<sub>50</sub>, sendo  
266 considerados significativamente diferentes quando não houve sobreposição desses intervalos,  
267 a 95% de probabilidade.

268 Os estimadores de Kaplan-Meier (método de Log-Rank) foram utilizados para avaliar a  
269 sobrevivência (horas) das abelhas após a ingestão dos tratamentos. As curvas de sobrevivência  
270 foram comparadas pelo teste de Holm-Sidak ( $P < 0,05$ ), por meio do software SigmaPlot versão  
271 12.3 (Systat Software, San Jose, CA, USA).

272 Para os testes de atratividade e repelência, após a tomada das imagens as abelhas foram  
273 contabilizadas. A normalidade dos dados foi verificada através de Shapiro-Wilk e a  
274 homocedasticidade das variâncias por Bartlett. Nos dados referentes aos atrativos alimentares  
275 (com e sem a presença de inseticida) que apresentaram distribuição normal, foi realizada a  
276 análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ),  
277 a fim de investigar possíveis diferenças significativas na intensidade de forrageamento. Já nos  
278 dados que apresentaram distribuição não normal, foi realizado o teste de Kruskal Wallis, sendo  
279 as médias comparadas pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni ( $P < 0,05$ ). Para os dados  
280 referentes às iscas de pronto uso, com distribuição normal, as médias foram comparadas pelo  
281 teste t ( $P < 0,05$ ), enquanto àqueles com distribuição não normal foram submetidos ao teste de  
282 Wilcoxon. Utilizou-se o programa R<sup>®</sup> (R Development Core Team 2015) para execução das  
283 análises dos experimentos de atratividade e repelência.

284

### 285 3. Resultados

286 Os testes de toxicidade aguda realizados com as formulações de iscas tóxicas acrescidas  
287 por malationa e espinosade apresentaram diferentes níveis de toxicidade para *P. emerina* e *T.*  
288 *fiebrigi*, dependendo da espécie e do atrativo alimentar utilizado (Tabelas 1 e 2).

289 Os valores de CL<sub>50</sub> para Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, melação de cana-de-açúcar e  
290 Samaritá Tradicional<sup>®</sup> acrescidos com malationa, após a exposição oral, foram  
291 significativamente diferentes para *P. emerina* (Tabela 1). A CL<sub>50</sub> variou de 12,28 a 121,71 ng  
292 i.a./μL de dieta, sendo a ordem de toxicidade (em ordem decrescente) Samaritá Tradicional<sup>®</sup> >  
293 melação de cana-de-açúcar > Biofruit<sup>®</sup> > Anamed<sup>®</sup> > Flyral<sup>®</sup>. Os atrativos alimentares  
294 associados ao inseticida malationa apresentaram os valores de CL<sub>50</sub> de 16,62 a 94,45 ng/μL de  
295 dieta para *T. fiebrigi* e seguiu a seguinte ordem decrescente de toxicidade: Samaritá  
296 Tradicional<sup>®</sup> > melação de cana-de-açúcar > Flyral<sup>®</sup> = Biofruit<sup>®</sup> > Anamed<sup>®</sup>. As diferenças

297 significativas nos valores de  $CL_{50}$  foram evidenciadas pela não sobreposição dos intervalos de  
298 confiança de 95% (Tabela 1).

299 Por outro lado, os valores de  $CL_{50}$  para espinosade combinado com Anamed<sup>®</sup> (*P.*  
300 *emerina* 52,86 ng i.a./ $\mu$ L de dieta; *T. fiebrigi* 45,65 ng a.i./ $\mu$ L de dieta), Biofruit<sup>®</sup> (*P. emerina*  
301 39,80 ng i.a./ $\mu$ L de dieta; *T. fiebrigi* 39,07 ng a.i./ $\mu$ L de dieta) e Flyral<sup>®</sup> (*P. emerina* 39,76 ng  
302 i.a./ $\mu$ L de dieta; *T. fiebrigi* 55,08 ng a.i./ $\mu$ L de dieta) não diferiram entre si para a mesma  
303 espécie, bem como não diferiram entre as espécies, demonstrado pela sobreposição dos  
304 intervalos de confiança (Tabela 2). Samaritá Tradicional<sup>®</sup> e Melão de cana-de-açúcar e quando  
305 associados ao inseticida espinosade mostraram-se mais tóxicos, com valores de  $CL_{50}$  variando  
306 de 6,92 a 10,61 ng i.a./ $\mu$ L de dieta para *P. emerina*, respectivamente, e não apresentaram  
307 diferença significativa entre si (Tabela 2). Samaritá Tradicional<sup>®</sup> associada ao inseticida  
308 espinosade mostrou-se mais tóxico, com valor de  $CL_{50}$  de 4,37 ng a.i./ $\mu$ L de dieta para *T.*  
309 *fiebrigi*, diferiu significativamente dos demais tratamentos. Melão de cana-de-açúcar  
310 apresentou  $CL_{50}$  de 15,48 ng a.i./ $\mu$ L de dieta para *T. fiebrigi* e também diferiu dos demais  
311 atrativos testados e associados ao inseticida espinosade (Tabela 2).

312 As operárias de ambas as espécies testadas não apresentaram diferença no consumo do  
313 alimento com adição de inseticida, quando comparado aos seus grupos controles (atrativo  
314 alimentar sem inseticida), demonstrado pela ANOVA: *P. emerina* - malationa (Anamed<sup>®</sup>:  $F=$   
315 0,14,  $P=$  0,99,  $GL=$  7; Biofruit<sup>®</sup>:  $F=$  0,28,  $P=$  0,59,  $GL=$  7; Flyral<sup>®</sup>:  $F=$  0,38,  $P=$  0,58,  $GL=$  7;  
316 Melão de cana-de-açúcar:  $F=$  0,38,  $P=$  0,57,  $GL=$  7; Samaritá Tradicional<sup>®</sup>:  $F=$  0,15,  $P=$  0,99,  
317  $GL=$  7); espinosade (Anamed<sup>®</sup>:  $F=$  0,14,  $P=$  0,94,  $GL=$  7; Biofruit<sup>®</sup>:  $F=$  0,05,  $P=$  0,83,  $GL=$  7;  
318 Flyral<sup>®</sup>:  $F=$  0,06,  $P=$  0,80,  $GL=$  7; Melão de cana-de-açúcar:  $F=$  0,05,  $P=$  0,94,  $GL=$  7;  
319 Samaritá Tradicional<sup>®</sup>:  $F=$  0,08,  $P=$  0,99,  $GL=$  7); *T. fiebrigi* - malationa (Anamed<sup>®</sup>:  $F=$  0,17,  
320  $p=$  0,93,  $GL=$  8; Biofruit<sup>®</sup>:  $F=$  0,07,  $p=$  0,93,  $GL=$  8; Flyral<sup>®</sup>:  $F=$  0,18,  $p=$  0,67,  $GL=$  8; Melão  
321 de cana-de-açúcar:  $F=$  0,04,  $p=$  0,83,  $GL=$  7; Samaritá Tradicional<sup>®</sup>:  $F=$  0,53,  $p=$  0,99,  $GL=$  8);

322 espinosade (Anamed<sup>®</sup>: F= 0,14, p= 0,85, GL= 8; Biofruit<sup>®</sup>: F= 0,01, p= 0,97, GL= 8; Flyral<sup>®</sup>:  
323 F= 0,07, p= 0,93, GL= 8; Melão de cana-de-açúcar: F= 0,03, p= 0,84, GL= 8; Samaritá  
324 Tradicional<sup>®</sup>: F= 0,18, p= 0,89, GL= 8).

325 A sobrevivência das operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi* exibiu diferenças  
326 significativas entre os tratamentos quando expostas às diferentes iscas tóxicas via oral (Log-  
327 Rank= 971,21; GL= 12;  $P < 0,001$  e Log-Rank= 809,71; GL= 12;  $P < 0,001$ , respectivamente)  
328 (Figuras 4 e 5). Gelsura<sup>®</sup>, na concentração 0,2%, ocasionou uma rápida mortalidade às operárias  
329 das duas espécies (tempo letal mediano [TL<sub>50</sub> {±EP}] = 0,65 ± 0,02 horas para *P. emerina* e  
330 0,78 ± 0,08 para *T. fiebrigi*). Os atrativos alimentares Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, melão de  
331 cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup> associados ao inseticida malationa, causaram rápida  
332 mortalidade às operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi*, sendo a sobrevivência média das abelhas  
333 inferior à três horas (Figuras 4 e 5).

334 Em contraste, Success<sup>®</sup> proporcionou TL<sub>50</sub> de 25,61±4,23 horas para *P. emerina* e  
335 22,23±3,51 horas para *T. fiebrigi*, não diferindo significativamente das iscas Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>  
336 e Samaritá Tradicional<sup>®</sup> associadas ao inseticida espinosade. Os atrativos Anamed<sup>®</sup> e melão  
337 de cana-de-açúcar somados ao inseticida espinosade causaram rápida mortalidade às operárias  
338 de *P. emerina* (TL<sub>50</sub> [± EP] = 9,06 ± 1,59 horas; TL<sub>50</sub> [± EP] = 7,11 ± 0,78 horas) e *T. fiebrigi*  
339 (TL<sub>50</sub> [± EP] = 8,93 ± 1,56 horas; TL<sub>50</sub> [± EP] = 4,21 ± 0,32 horas) e diferiram dos demais  
340 atrativos contendo o inseticida espinosade. Todos os tratamentos combinados com os dois  
341 inseticidas diferiram do grupo controle, que não apresentou redução na sobrevivência durante  
342 o período do teste (Figuras 4 e 5).

343 Não foi possível realizar a avaliação de atratividade e repelência no campo com as  
344 operárias de *T. fiebrigi*, pois a metodologia testada demonstrou ser inviável para essa espécie  
345 de abelha sem ferrão. Não foi possível obter o mínimo de 25 abelhas forrageando as estações  
346 de treinamento, além disso, no momento em que o alimentador de treinamento foi substituído

347 pela placa de experimento, o número de visitas de forrageiras de *T. fiebrigi* reduziu a zero  
348 (Tabela 3).

349 De acordo com os resultados obtidos através dos testes de campo, os atrativos  
350 alimentares e as formulações de iscas tóxicas não foram atrativos para as forrageiras de *P.*  
351 *emerina*. Também, observou-se que as abelhas se afastaram rapidamente das estações de iscas  
352 quando as posições das placas foram trocadas. Foi observado que nos momentos em que o  
353 número de abelhas foi alto, com mais de 50 se alimentando na placa, sua atividade nas  
354 proximidades do controle (sacarose) para se alimentar tornou-se mais intensa e os  
355 desembarques tornaram-se mais frequentes (Tabela 4).

356 Dentre os atrativos alimentares, Anamed<sup>®</sup> sem inseticida e associado à malationa e ao  
357 espinosade foi apresentou visitação forrageira significativamente reduzida quando comparado  
358 aos controles, confirmando um efeito repelente para este composto (Figuras 6 e 7). Além disso,  
359 menor número de forrageiras foram observadas na estação que continha Anamed<sup>®</sup> associado  
360 com malationa em relação às estações que continham somente o atrativo Anamed<sup>®</sup> e o controle  
361 (Figura 6).

362 Não ocorreu diferença na intensidade do forrageiro para os atrativos Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>,  
363 melação de cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup>, associados ou não aos inseticidas malationa  
364 e espinosade, portanto, não apresentaram efeito repelente significativo quando comparados aos  
365 seus respectivos controles (Figuras 6 e 7). Entretanto, o efeito repelente com níveis de  
366 forrageamento significativamente menores foi observado para as duas iscas tóxicas de pronto  
367 uso Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup>. Durante o experimento, as abelhas optaram pelo forrageamento na  
368 estação controle em detrimento da estação com a formulação de pronto uso (Figura 8).

369

#### 370 4. Discussão

371 A exposição de operárias adultas de *P. emerina* e *T. fiebrigi* às formulações de iscas  
372 tóxicas contendo os agentes letais malationa e espinosade demonstra a alta suscetibilidade  
373 dessas espécies a tais compostos. De acordo com os resultados obtidos nos testes de toxicidade  
374 oral aguda, foi observado que as concentrações utilizadas para os inseticidas malationa e  
375 espinosade para uso em iscas tóxicas para o controle de *A. fraterculus* em pomares de maçã no  
376 Brasil são consideravelmente mais elevadas do que os valores de CL<sub>50</sub> determinados neste  
377 estudo. A concentração recomendada do inseticida malationa (Malathion<sup>®</sup> 1000 EC) é 20,11;  
378 36,22; 16,43; 62,32 e 162,86 vezes o valor da CL<sub>50</sub> para *P. emerina* e 21,75; 26,61; 28,57; 54,01  
379 e 120,34 vezes o valor da CL<sub>50</sub> para *T. fiebrigi* quando associada ao atrativo Anamed<sup>®</sup>,  
380 Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, melão de cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup>, respectivamente. A  
381 concentração recomendada do inseticida espinosade (Tracer<sup>®</sup>) é 1,81; 2,41; 2,41; 9,05 e 13,87  
382 vezes o valor da CL<sub>50</sub> para *P. emerina* e 2,10; 2,45; 1,74; 6,20 e 21,96 vezes o valor da CL<sub>50</sub>  
383 para *T. fiebrigi*, quando associada ao atrativo Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, melão de cana-de-  
384 açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup>, respectivamente.

385 Além disso, atrativos alimentares associados ao inseticida espinosade mostraram maior  
386 toxicidade via ingestão às abelhas em relação ao inseticida malationa. Corroborando com os  
387 resultados encontrados no presente trabalho, Schutze et al. (2018) verificaram a elevada  
388 toxicidade de iscas tóxicas compostas pela associação de atrativos alimentares ao inseticida  
389 espinosade em *A. fraterculus*, apresentando valores de CL<sub>50</sub> de 97,69 mg.L<sup>-1</sup> para melão de  
390 cana-de-açúcar, 15,19 mg.L<sup>-1</sup> para Biofruit<sup>®</sup>, 49,69 mg.L<sup>-1</sup> para Flyral<sup>®</sup> e 27,84 mg.L<sup>-1</sup> para  
391 Samaritá Tradicional<sup>®</sup>.

392 Estudos realizados com a isca tóxica a base de espinosade GF-120<sup>®</sup>, demonstraram alta  
393 toxicidade desta formulação sobre operárias de *A. mellifera* e sobre os parasitoides *Fopius*  
394 *arisanus* (Sonan), *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) e *Pysttalia fletcheri* (Silvestri)  
395 (Hymenoptera: Braconidae) (Edwards et al., 2003; Wang et al., 2005). GF-120 também

396 apresentou alta toxicidade em adultos de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) quando  
397 os parasitoides foram expostos à essa substância em laboratório, entretanto, em estudos de semi-  
398 campo a alta toxicidade não foi observada (Ruiz et al. 2008)

399 O espinosade é derivado da fermentação aeróbica de *Saccharopolyspora spinosa* Mertz  
400 e Yao (Bacteria: Actinobacteridae) e possui em sua composição a espinosina A e espinosina D  
401 (Sparks et al., 1998; Sparks et al., 2001). O modo de ação do espinosade se dá através de contato  
402 direto com a superfície do corpo do inseto ou ingestão, a qual é mais eficiente. Esse inseticida  
403 possui o mecanismo de ação que envolve a disrupção dos receptores de acetilcolina e ácido  
404 aminobutírico (GABA) do sistema nervoso dos insetos (Salgado; Sparks, 2010; Kirst, 2010).  
405 Outro diferencial dessa molécula é a sua atividade em baixas doses, promovendo mortalidades  
406 semelhantes às causadas por Organofosforados, Piretroides e Carbamatos (Leonard et al.,  
407 1996). Ademais, iscas associadas ao inseticida espinosade mostram-se mais palatáveis aos  
408 insetos benéficos do que às associadas ao inseticida malationa (Michaud, 2003).

409 Atrativos alimentares associados ao inseticida malationa, apesar de serem menos tóxicos  
410 quando comparados à sua associação ao inseticida espinosade, também se apresentaram  
411 altamente tóxicos às operárias de *P. emerina* e *T. fiebriri*. Os Organofosforados são compostos  
412 neurotóxicos que inibem a acetilcolinesterase (AChE), a qual é responsável pela hidrólise da  
413 acetilcolina (ACh) nas regiões sinápticas das terminações nervosas colinérgicas. Dessa forma,  
414 a alta mortalidade aguda alcançada por esse inseticida em abelhas sem ferrão é uma  
415 consequência da interação do inseticida com seu sítio primário de ação nestas espécies após a  
416 exposição a doses letais (Fukuto, 1990; Casida; Durkin, 2013).

417 Melão de cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup>, associados aos inseticidas  
418 espinosade e malationa, apresentaram os menores valores de CL<sub>50</sub> quando comparados aos  
419 demais atrativos testados. Samaritá Tradicional também se mostrou mais tóxica à *D.*  
420 *longicaudata* quando associada aos inseticidas a base de Espinosinas (Baldin et al., 2018). Esse

421 fato pode estar relacionado à presença de açúcares na formulação dos dois atrativos. O melão  
422 de cana-de-açúcar é um substrato rico em açúcares fermentáveis e minerais, tais como  
423 manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio (Feltrin et al., 2000). A isca  
424 Samaritá Tradicional<sup>®</sup> também é composta por açúcares redutores, além de proteína hidrolisada  
425 de milho e conservantes. Iscas tóxicas que contém a combinação de proteína com açúcar podem  
426 permitir maior estímulo à busca e ingestão das formulações pelos insetos não alvo.

427       Formulações de iscas tóxicas contendo alfa-cipermetrina e malationa causam  
428 mortalidade de adultos de *P. emerina* e *T. fiebrigi* mais rápida quando comparadas com  
429 formulações de iscas tóxicas contendo espinosade. Tal efeito pode estar associado  
430 principalmente ao efeito “knock-down” dos Piretroides e a rápida ação de Organofosforados  
431 sobre insetos adultos (Casida; Durkin, 2013). O atrativo alimentar Biofruit<sup>®</sup> associado a  
432 malationa também causou elevada mortalidade à *A. fraterculus* quando comparado a isca de  
433 pronto uso Success e Anamed associado ao espinosade nas primeiras dez horas após a exposição  
434 (Borges et al. 2015). A isca de pronto uso Gelsura também causou rápida mortalidade à  
435 operárias adultas de *A. mellifera* quando oferecida via ingestão, com TL<sub>50</sub> de 0,71 horas (Rosa,  
436 2016), resultado semelhante ao obtido nesse trabalho.

437       Foi possível observar alta mortalidade de todas as iscas testadas associadas aos  
438 inseticidas alfa-cipermetrina, espinosade e malationa, pois reduziram a sobrevivência média  
439 das abelhas para valores inferiores a 48 horas após a exposição. Resultado semelhante foi  
440 observado por Borges et al. (2015), que observaram efeito semelhante entre Biofruit<sup>®</sup> +  
441 malationa, Anamed<sup>®</sup> + espinosade e Success<sup>®</sup> na mortalidade de adultos de *A. fraterculus* a  
442 partir de 16 horas após a exposição. Por outro lado, Success<sup>®</sup> reduziu a sobrevivência média  
443 de operárias de *A. mellifera* somente 65,67 horas após a ingestão da isca tóxica (Rosa, 2016).  
444 A menor mortalidade inicial e um aumento gradual da mortalidade com o passar do tempo,

445 pode ocorrer em função da necessidade de ingestão desse inseticida por parte dos insetos  
446 (Vontas et al., 2011).

447 Além da alta toxicidade dos inseticidas avaliados, que causa elevada mortalidade das  
448 operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi*, as abelhas adultas não sobrevivem por longos períodos  
449 sem alimentação, visto que não possuem reservas consideráveis de carboidratos, proteínas ou  
450 lipídios em seus corpos, o que as obriga se alimentarem das fontes disponíveis (Kunert;  
451 Crailsheim, 1988; Hrassnigg; Crailsheim, 2005). Quando necessitam de energia, as operárias  
452 se abastecem com açúcares em sua colheita de mel, que obtêm de reservas de mel ou através de  
453 contatos trofílaticos. Barker e Lehner (1978) observaram que as abelhas engaioladas,  
454 alimentadas exclusivamente com carboidratos, sobrevivem bem em sacarose ou xarope de  
455 milho rico em frutose.

456 Alguns açúcares, como manose, galactose, arabinose, xilose, melibiose, rafinose,  
457 estaquiose e lactose são tóxicos para as abelhas (Barker; Lehner, 1974; Barker, 1977). Outra  
458 substância tóxica para as abelhas é a hidroximetilfurfural (HMF), formada a partir da  
459 desidratação catalisada por ácido de açúcares hexose, especialmente frutose, e formada no mel  
460 como resultado do tratamento térmico ou armazenamento. Altos níveis de HMF também devem  
461 ser considerados como um risco quando estas abelhas se alimentam de açúcares invertidos  
462 (Brodschneider; Crailsheim, 2010).

463 As proteínas hidrolisadas fornecem aminoácidos livres para nutrição e reprodução das  
464 moscas-das-frutas, bem como a ação foto-estimulatória, que causa a rápida busca dessas  
465 substâncias (Vargas; Prokopy, 2006). Ademais, essas substâncias podem ser utilizadas na  
466 nutrição das colmeias pelas abelhas operárias. A demanda específica de proteína ocorre de  
467 acordo com a idade das abelhas: operárias jovens sofrem alterações fisiológicas, como a  
468 maturação dos músculos do voo (Hersch et al., 1978). Também, o consumo de proteína é

469 necessário para desenvolver as glândulas hipofaríngeas e os ovários, no caso da rainha (Pernal;  
470 Currie, 2000; Alqarni, 2006; Hoover et al., 2006).

471 A busca por recursos para a colmeia em ambiente externo é uma das características  
472 consideradas mais notáveis dos insetos sociais, advindas do esforço coletivo de inúmeros  
473 indivíduos (Robinson; Page, 1989). Durante o forrageamento, as abelhas estão expostas a um  
474 fluxo constante de estímulos sensoriais, sendo seres sensíveis a odores, cores e sabores (Dyer;  
475 Chittka, 2004). Nesse sentido, as iscas tóxicas, fontes de açúcares e proteínas, podem ser  
476 atrativas às abelhas forrageiras que estão em busca de recursos para a colmeia.

477 Entretanto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, os atrativos  
478 alimentares Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, melação de cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup>,  
479 associados ou não aos inseticidas espinosade e malationa, e as iscas de pronto uso Gelsura<sup>®</sup> e  
480 Success<sup>®</sup> não foram atrativas as operárias forrageiras durante os testes no campo. Resultados  
481 semelhantes foram observados por Rosa (2016) para os atrativos Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>  
482 e melação de cana-de-açúcar, e para as iscas Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup>. O autor comenta que o  
483 forrageamento do controle contendo mel 30% foi constante durante todas as avaliações, não  
484 sendo observada a atratividade dos componentes e iscas tóxicas para *A. mellifera*. Além disso,  
485 observou das poucas abelhas melíferas que pousaram sobre as placas, nenhuma apresentou  
486 interesse em se alimentar dos tratamentos e logo alçavam voo, retirando-se do local.

487 Geralmente, durante o período de forrageamento, as operárias reconhecem informações  
488 relevantes para realizar importantes tarefas, como, por exemplo, localizar os itens alimentares  
489 mais gratificantes e detectar a presença de predadores (Clark; Dukas, 2003). Uma abelha  
490 forrageira passará a maior parte do tempo escolhendo entre alvos visuais que variam de cor,  
491 forma e padrão, e estão sob pressão constante para selecionar as fontes alimentares mais  
492 gratificantes, minimizando o risco de predação e os custos energéticos (Chittka; Menzel, 1992).  
493 Esse comportamento das abelhas forrageiras pode explicar o fato das abelhas preferirem a

494 estação que continha o tratamento controle (fonte mais benéfica para a colmeia) em detrimento  
495 das estações que continham os atrativos alimentares com e sem inseticida ou as iscas de pronto  
496 uso.

497 No entanto, as atividades de voo de operárias também estão relacionadas a condições  
498 externas, como a disponibilidade de recursos vegetais, fatores abióticos e condições internas  
499 das colônias (Pierrot; Schlindwein, 2003; Souza et al., 2006). Por isso, em condições extremas  
500 de falta de alimento ou se as iscas forem depositadas muito próximas de fontes potencialmente  
501 atrativas às abelhas, é importante determinar se os atrativos alimentares associados ou não aos  
502 inseticidas e as iscas de pronto uso possuem alguma atividade repelente às abelhas nativas.

503 Os resultados dos experimentos de repelência indicaram que, das sete formulações de  
504 iscas tóxicas para a supressão populacional de moscas-das-frutas no Brasil, apenas três  
505 (Anamed<sup>®</sup> puro ou em mistura com malationa e espinosade; Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup>) apresentaram  
506 poder repelente capaz de afastar as abelhas forrageiras de *P. emerina* de uma fonte de alimento  
507 extremamente atrativa, como a sacarose 50%. Anamed<sup>®</sup> oferecido puro ou em mistura com o  
508 inseticida malationa e Gelsura<sup>®</sup> também apresentaram efeito significativo de repelência ao  
509 forrageio de *A. mellifera* (Rosa, 2016).

510 Segundo Ingram et al. (2015), inseticidas Piretroides, a exemplo do presente na isca  
511 tóxica Gelsura<sup>®</sup>, têm sido reportados por representar um risco reduzido às abelhas, devido às  
512 suas baixas taxas de aplicação no campo e às suas propriedades repelentes, as quais podem  
513 alterar o comportamento de forrageamento evitando com que as abelhas entrem em contato com  
514 esse inseticida no campo. Em hipótese, o efeito repelente sobre *P. emerina* apresentado pelo  
515 atrativo Anamed<sup>®</sup> e pelas iscas tóxicas de pronto uso Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup> se deve a algum dos  
516 componentes em suas fórmulas.

517 Segundo Mangan e Moreno (2009), os componentes usados na isca tóxica GF-120 não  
518 foram atrativos ao forrageio de *A. mellifera*. Utilizando metodologia distinta em experimentos

519 comparando abelhas nativas e *A. mellifera*, Gómez-Escobar et al. (2014) mostraram que GF-  
520 120 misturado com mel (40% GF-120: 50% mel: 10% água) foi considerado repelente para as  
521 abelhas *Trigona fulviventris* Guérin e *Scaptotrigona mexicana* Guérin-Meneville  
522 (Hymenoptera: Apidae: Meliponini), mas não desencorajou o forrageamento de *A. mellifera*.

523 Entretanto, Sánchez et al. (2012) relataram que a formulação GF-120 não foi rejeitada  
524 pela abelha sem ferrão *Plebeia moureana* Ayala (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) quando  
525 misturado com solução de sacarose em uma época de escassez de alimento. Os autores  
526 concluíram que é provável que as abelhas forrageiras de *P. moureana* não serão desencorajadas  
527 a coletar néctar em uma área tratada com GF-120 (Sánchez et al., 2012). Rosa (2016) também  
528 não encontrou efeito repelente da isca Success<sup>®</sup> sobre *A. mellifera* em testes de campo  
529 realizados no sul do Brasil.

530 Os demais tratamentos não apresentaram efeito repelente sobre *P. emerina* no campo.  
531 As abelhas visitaram as estações para forrageio de sacarose 50% sem apresentar qualquer  
532 perturbação com a presença de Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, melação de cana-de-açúcar e Samaritá  
533 Tradicional<sup>®</sup> oferecidos com e sem a presença dos inseticidas malationa e espinosade. Os  
534 atrativos Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup> e melação de cana-de-açúcar também apresentaram resultados  
535 semelhantes quando testados com operárias de abelhas melíferas (Rosa, 2016).

536 A metodologia avaliada nesse estudo pode ser considerada rigorosa, já que oferece um  
537 componente (sacarose 50%) extremamente atrativo às abelhas, no centro de placas que contém  
538 formulações de iscas tóxicas. Por outro lado, o estudo torna evidente e conclusivo que abelhas  
539 que não visitam estações contendo uma quantidade de sacarose rodeada de certa substância,  
540 estão sendo efetivamente repelidas. Conclusão semelhante foi obtida por Rosa (2016), que  
541 utilizou como atrativo padrão o mel puro para *A. mellifera*.

542 Além disso, é fundamental que sejam conduzidos estudos com outras espécies nativas  
543 de abelhas polinizadoras, visto que há diferença comportamental de forrageamento entre

544 espécies. As operárias de *T. fiebrigi* não apresentaram o mesmo comportamento de  
545 recrutamento para as estações artificiais de treinamento quando comparadas com as operárias  
546 de *P. emerina*, embora as condições para os testes com as duas espécies tenham sido as mesmas.  
547 Os resultados obtidos nesse trabalho não corroboram com os obtidos por Kaehler (2017), que  
548 estudou o forrageamento e recrutamento de operárias de *T. fiebrigi*, na região de Porto Alegre,  
549 Rio Grande do Sul, utilizando alimentadores artificiais semelhantes aos utilizados nesse  
550 trabalho e obteve um número superior a 25 abelhas forrageando as estações contendo xarope  
551 de sacarose (50%).

552         A coleta de recursos realizada pelas abelhas sem ferrão é influenciada por fatores  
553 abióticos como temperatura, umidade e radiação, pela paisagem, seja ela natural ou alterada, e  
554 pela quantidade e qualidade dos recursos alimentares (Hilário et al. 2001; Figueiredo-Mecca et  
555 al. 2013; Kaluza et al. 2016; Kaehler, 2017). Além destes fatores, o custo energético durante o  
556 forrageio também é importante, e operárias podem voar por distâncias maiores se o recurso for  
557 considerado de qualidade (Heinrich, 1979; Cresswell et al., 2000). A teoria de forrageio ótimo  
558 prevê que a utilização de recursos de baixa qualidade em uma dieta depende da taxa de encontro  
559 de recursos mais rentáveis (Kamil et al., 2012). Com isso, ao encontrar recursos considerados  
560 de maior qualidade, as abelhas poderão aumentar o número de operárias em áreas onde estão  
561 localizados os melhores recursos e diminuir o número de visitas a locais onde a recompensa é  
562 menor (Real, 1981). Uma provável explicação para a baixa taxa de visitação das abelhas em  
563 nossos trabalhos pode estar na configuração da paisagem e na possível presença de plantas que  
564 ofereceram uma melhor recompensa para a colmeia.

565

## 566                 **5. Conclusão**

567

568 Os atrativos alimentares Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, melação de cana-de-açúcar e  
569 Samaritá Tradicional<sup>®</sup> associados aos inseticidas malationa e espinosade e as iscas tóxicas  
570 Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup> são letais para as abelhas sem ferrão *P. emerina* e *T. fiebrigi* em  
571 laboratório.

572 As formulações de iscas tóxicas Anamed<sup>®</sup>, Biofruit<sup>®</sup>, Flyral<sup>®</sup>, melação de cana-de-açúcar  
573 e Samaritá Tradicional<sup>®</sup> associados aos inseticidas malationa e espinosade e as iscas tóxicas  
574 Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup> não são atrativas para *P. emerina*.

575 Anamed<sup>®</sup>, Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup> são repelentes às forrageiras em campo.

576

## 577 **6. Agradecimentos**

578 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de  
579 Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores  
580 também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
581 (CNPq) e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Centro Nacional de  
582 Pesquisa Uva e Vinho pela concessão de bolsas de estudos e suporte financeiro.

583

## 584 **7. Referências**

585 Alqarni, A. S. (2006). Influence of some protein diets on the longevity and some physiological  
586 conditions of honeybee *Apis mellifera* L. workers. **Journal of Biological Sciences**, 6(4), 734-  
587 737.

588 Baldin, M. M., Schutze, I. X., Baronio, C. A., Garcia, F. R. M., & Botton, M. (2018).  
589 Concentration and lethal time of toxic baits based on spinosyns on *Ceratitidis capitata* and  
590 *Diachasmimorpha longicaudata*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 48(3), 323-330.

- 591 Barker, R. J., & Lehner, Y. (1974). Acceptance and sustenance value of naturally occurring  
592 sugars fed to newly emerged adult workers of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of**  
593 **experimental zoology**, 187(2), 277-285.
- 594 Barker, R. J. (1977). Some carbohydrates found in pollen and pollen substitutes are toxic to  
595 honey bees. **The Journal of Nutrition**, 107(10), 1859-1862.
- 596 Barker, R. J., & Lehner, Y. (1978). Laboratory comparison of high fructose corn syrup, grape  
597 syrup, honey, and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees. **Apidologie**, 9(2),  
598 111-116.
- 599 Borges, R., Junior, R. M., Boff, M. I. C., & Botton, M. (2015). Efeito de iscas tóxicas sobre  
600 *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **BioAssay**, 10.
- 601 Botton, M.; Arioli, C. J.; Machota-Júnior, R.; Nunes, M. Z.; Rosa, J. M. (2016). Moscas-das-  
602 frutas na fruticultura de clima temperado: situação atual e perspectivas de controle através do  
603 emprego de novas formulações de iscas tóxicas e da captura massal. **Agropecuária**  
604 **Catarinense**, 29, 103-107.
- 605 Brodschneider, R., & Crailsheim, K. (2010). Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**,  
606 41(3), 278-294.
- 607 Broothaerts, W., Van Nerum, I., & Keulemans, J. (2004). Update on and review of the  
608 incompatibility (S-) genotypes of apple cultivars. **HortScience**, 39(5), 943-947.
- 609 Cabrera-Marín, N. V., Liedo, P., & Sánchez, D. (2016). The effect of application rate of GF-  
610 120 (Spinosad) and Malathion on the mortality of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae)  
611 foragers. **Journal of economic entomology**, 109(2), 515-519.
- 612 Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance,  
613 and secondary effects. **Annual review of entomology**, 58, 99-117.
- 614 Castilhos, R. V., Grützmacher, A. D., Nava, D. E., Zotti, M. J., Siqueira, P. R. B., & Spagnol,  
615 D. (2013). Selectivity of pesticides used in peach orchards on the larval stage of the predator

- 616 *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Semina: Ciências Agrárias,**  
617 **Londrina**, 34 (1), 3585-3596.
- 618 Castilhos, R. V., Grützmacher, A. D., Neves, M. B. D., Moraes, Í. L. D., & Gauer, C. J. (2017).  
619 Selectivity of insecticides used in peach farming to larvae of *Chrysoperla externa* (Neuroptera:  
620 Chrysopidae) in semi-field conditions. **Revista Caatinga**, 30(1), 109-115.
- 621 Chittka, L., & Menzel, R. (1992). The evolutionary adaptation of flower colours and the insect  
622 pollinators' colour vision. **Journal of Comparative Physiology A**, 171(2), 171-181.
- 623 Chueca, P., Montón, H., Ripollés, J. L., Castañera, P., Moltó, E., & Urbaneja, A. (2007).  
624 Spinosad bait treatments as alternative to malathion to control the Mediterranean fruit fly  
625 *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in the Mediterranean Basin. **Journal of Pesticide**  
626 **Science**, 32(4), 407-411.
- 627 Clark, C. W., & Dukas, R. (2003). The behavioral ecology of a cognitive constraint: limited  
628 attention. **Behavioral Ecology**, 14(2), 151-156.
- 629 Cresswell, J. E., Osborne, J. L., & Goulson, D. (2000). An economic model of the limits to  
630 foraging range in central place foragers with numerical solutions for bumblebees. **Ecological**  
631 **Entomology**, 25(3), 249-255.
- 632 Devillers, J. (2003). Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: Honey Bees, CRC Press,  
633 70-80.
- 634 Dyer, A. G., & Chittka, L. (2004). Biological significance of distinguishing between similar  
635 colours in spectrally variable illumination: bumblebees (*Bombus terrestris*) as a case study.  
636 **Journal of Comparative Physiology A**, 190(2), 105-114.
- 637 Edwards, C. R., Gerber, C. K., & Hunt, G. J. (2003). A laboratory study to evaluate the toxicity  
638 of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, bait, Success 0.02 CB, to the honey bee, *Apis*  
639 *mellifera*. **Apidologie**, 34(2), 171-180.

- 640 Eltz, T., Brühl, C. A., & Görke, C. (2002). Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of  
641 pollen by the stingless bee *Trigona collina*. **Insectes sociaux**, 49(1), 28-30.
- 642 Epsky, N. D., Midgarden, D., Rendón, P., Villatoro, D., & Heath, R. R. (2012). Efficacy of wax  
643 matrix bait stations for Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Journal of economic**  
644 **entomology**, 105(2), 471-479.
- 645 Feltrin, V. P., Sant'Anna, E. S., Porto, A., & Torres, R. C. (2000). Produção de *Lactobacillus*  
646 *plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**,  
647 43(1), 5-9.
- 648 Figueiredo-Mecca, G., Bego, L. R., & do Nascimento, F. S. (2013). Foraging behavior of  
649 *Scaptotrigona depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) and its relationship with temporal  
650 and abiotic factors. **Sociobiology**, 60(3), 267-282.
- 651 Fukuto, T. R. (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides.  
652 **Environmental health perspectives**, 87, 245-254.
- 653 Gómez-Escobar, E., Liedo, P., Montoya, P., Vandame, R., & Sánchez, D. (2014). Behavioral  
654 response of two species of stingless bees and the honey bee (Hymenoptera: Apidae) to GF-120.  
655 **Journal of economic entomology**, 107(4), 1447-1449.
- 656 Härter, W. R., Grützmacher, A. D., Nava, D. E., da Silva Gonçalves, R., & Botton, M. (2010).  
657 Isca tóxica e disrupção sexual no controle da mosca-da-fruta sul-americana e da mariposa-  
658 oriental em pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 45(3), 229-235.
- 659 Härter, W. R., Botton, M., Nava, D. E., Grützmacher, A. D., da Silva Gonçalves, R., Junior, R.  
660 M., ... & Zanardi, O. Z. (2015). Toxicities and residual effects of toxic baits containing spinosad  
661 or malathion to control the adult *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida*  
662 *Entomologist*, 202-208.
- 663 Heinrich, B. (1976). The foraging specializations of individual bumblebees. **Ecological**  
664 **monographs**, 46(2), 105-128.

- 665 Hersch, M. I., Crewe, R. M., Hepburn, H. R., Thompson, P. R., & Savage, N. (1978). Sequential  
666 development of glycolytic competence in the muscles of worker honeybees. **Comparative**  
667 **Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, 61(3), 427-431.
- 668 Hilário, S. D., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Kleinert, A. D. M. P. (2001). Responses to climatic  
669 factors by foragers of *Plebeia pugnax* Moure (in litt.)(Apidae, Meliponinae). **Revista**  
670 **Brasileira de Biologia**, 61(2), 191-196.
- 671 Hoover, S. E., Higo, H. A., & Winston, M. L. (2006). Worker honey bee ovary development:  
672 seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. **Journal of Comparative**  
673 **Physiology B**, 176(1), 55.
- 674 Hrassnigg, N., & Crailsheim, K. (2005). Differences in drone and worker physiology in  
675 honeybees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, 36(2), 255-277.
- 676 Ingram, E. M. (2013). Toxic and repellent effects of pyrethroids used in orchards on the honey  
677 bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **M.S. Thesis**. University of Nebraska, Lincoln.
- 678 Ingram, E. M., Augustin, J., Ellis, M. D., & Siegfried, B. D. (2015). Evaluating sub-lethal  
679 effects of orchard-applied pyrethroids using video-tracking software to quantify honey bee  
680 behaviors. **Chemosphere**, 135, 272-277.
- 681 Jaffé, R., Pope, N., Carvalho, A. T., Maia, U. M., Blochtein, B., de Carvalho, C. A. L., ... &  
682 Venturieri, G. C. (2015). Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize  
683 stingless beekeeping. **PLoS One**, 10(3), 1-21.
- 684 Kaehler, T. G. (2017). **Forrageio de operárias de *Tetragonisca fiebrigi* (Apidae;**  
685 **Meliponini): potencial de obtenção de recursos e polinização**. Tese (Doutorado) – Programa  
686 de Pós-Graduação em Zoologia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 67.
- 687 Kaluza, B. F., Wallace, H., Heard, T. A., Klein, A. M., & Leonhardt, S. D. (2016). Urban  
688 gardens promote bee foraging over natural habitats and plantations. **Ecology and evolution**,  
689 6(5), 1304-1316.

- 690 Kamil, A. C., Krebs, J. R., & Pulliam, H. R. (Eds.). (2012). **Foraging behavior**. Springer  
691 Science & Business Media.
- 692 Kirst, H. A. (2010). The spinosyn family of insecticides: realizing the potential of natural  
693 products research. **The Journal of antibiotics**, 63(3), 101.
- 694 Kunert, K., & Crailsheim, K. (1988). Seasonal changes in carbohydrate, lipid and protein  
695 content in emerging worker honeybees and their mortality. **Journal of Apicultural Research**,  
696 27(1), 13-21.
- 697 Leonard, B. R., Graves, J. B., Burriss, E., Micinski, S., Mascarenhas, V., & Martin, S. H. (1996).  
698 Evaluation of selected commercial and experimental insecticides against lepidopteran cotton  
699 pests in Louisiana. In **Beltwide Cotton Conferences (USA)**. Nashville, TN, 285-830.
- 700 Mangan, R. L., & Moreno, A. T. (2009). Honey bee foraging preferences, effects of sugars, and  
701 fruit fly toxic bait components. **Journal of economic entomology**, 102(4), 1472-1481.
- 702 Mangan, R. L., & Moreno, D. S. (2014). Development of bait stations for fruit fly population  
703 suppression. **Journal of economic entomology**, 100(2), 440-450.
- 704 Michaud, J. P. (2003). Toxicity of fruit fly baits to beneficial insects in citrus. **Journal of Insect**  
705 **Science**, 3(1), 1-9.
- 706 Michener, C. D. (2013). The meliponini. In Pot-honey Springer, New York.
- 707 Nava, D. E., & Botton, M. (2010). Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis*  
708 *capitata* em pessegueiro. **Embrapa Uva e Vinho-Documentos (INFOTECA-E)**.
- 709 Navarro-Llopis, V., Primo, J., & Vacas, S. (2013). Efficacy of attract-and-kill devices for the  
710 control of *Ceratitis capitata*. **Pest management science**, 69(4), 478-482.
- 711 Nestel, D., Nemny-Lavy, E., Zilberg, L., Weiss, M., Akiva, R., & Gazit, Y. (2004). The fruit  
712 fly PUB: a phagostimulation unit bioassay system to quantitatively measure ingestion of baits  
713 by individual flies. **Journal of applied entomology**, 128(9-10), 576-582.

- 714 Nora, I.; Hickel, E. (2006). Pragas da macieira: dípteros e lepidópteros. In: EPAGRI (Ed.). **A**  
715 **cultura da macieira**. Florianópolis: GMC/Epagri, 463-486.
- 716 Nunes-Silva, P., Witter, S., Schlemmer, L., Halinski, R., Ramos, J., Arioli, C., Botton, M.  
717 Visitantes florais e potenciais polinizadores da cultura da macieira. **Embrapa Uva e Vinho-**  
718 **Comunicado Técnico** (INFOTECA-E).
- 719 OECD (1998). **Guidelines For The Testing Of Chemicals Number 213, Honeybees, Acute**  
720 **Oral Toxicity Test, OECD**. Environmental Health and Safety Division, Paris.
- 721 Orth, A. I. Levantamento das abelhas nativas (Hym., Apoidea) associadas às flores da macieira  
722 ('*Pyrus malus*' L.) (1984). **Anais do V Congresso Brasileiro de Apicultura**, Florianópolis,  
723 280-287.
- 724 Ortolan, S. M. L. S., & Laroca, S. (1996). Melissocenótica em áreas de cultivo de macieira  
725 (*Pyrus malus* L.) em Lages (Santa Catarina), com notas comparativas e experimento de  
726 polinização com *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera, Apoidea). **Acta Biológica**  
727 **Paranaense**, 25, 1-113.
- 728 Pernal, S. F., & Currie, R. W. (2000). Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets  
729 for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, 31(3), 387-409.
- 730 Petri, J. L., Hawerth, F. J., & Leite, G. B. (2008). Fenologia de espécies silvestres de macieira  
731 como polinizadora das cultivares Gala e Fuji. **Revista Brasileira de Fruticultura** 30(4), 868-  
732 874.
- 733 Pierrot, L. M., & Schlindwein, C. (2003). Variation in daily flight activity and foraging patterns  
734 in colonies of urucu-*Melipona scutellaris* Latreille (Apidae, Meliponini). **Revista Brasileira**  
735 **de Zoologia**, 20(4), 565-571.
- 736 Raga, A., Machado, R. A., Dinardo, W., & Strikis, P. C. (2006). Eficácia de atrativos  
737 alimentares na captura de moscas-das-frutas em pomar de citros. **Bragantia**, 65(2), 337-345.

- 738 Real, L. A. (1981). Uncertainty and pollinator-plant interactions: The foraging behavior of bees  
739 and wasps on artificial flowers. **Ecology**, 62(1), 20-26.
- 740 Ritz, C., Streibig, J. C. (2005). Bioassay Analysis using R. **J Stat Softw** 12:1-22.
- 741 Robinson, G. E., & Page, R. E. (1989). Genetic determination of nectar foraging, pollen  
742 foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**,  
743 24(5), 317-323.
- 744 Roubik, D. W. (1989). **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. New York, Cambridge  
745 University. 514.
- 746 Rosa, J. M. da. (2016). **Diagnóstico dos serviços de polinização em pomares de macieira e**  
747 **efeito de formulações de iscas tóxicas sobre *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera:**  
748 **Apidae) em laboratório e campo**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em  
749 Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, 109.
- 750 Ruiz, L., Flores, S., Cancino, J., Arredondo, J., Valle, J., Díaz-Fleischer, F., & Williams, T.  
751 (2008). Lethal and sublethal effects of spinosad-based GF-120 bait on the tephritid parasitoid  
752 *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, 44(3), 296-  
753 304.
- 754 Salgado, V. L., & Sparks, T. C. (2010). The spinosyns: chemistry, biochemistry, mode of  
755 action, and resistance. **Insect control: Biological and synthetic agents**, 207-243.
- 756 Sánchez, D., Solórzano, E. D. J., Liedo, P., & Vandame, R. (2012). Effect of the natural  
757 pesticide spinosad (GF-120 formulation) on the foraging behavior of *Plebeia moureana*  
758 (Hymenoptera: Apidae). **Journal of economic entomology**, 105(4), 1234-1237.
- 759 Slaa, E. J., Chaves, L. A. S., Malagodi-Braga, K. S., & Hofstede, F. E. (2006). Stingless bees  
760 in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, 37(2), 293-315.
- 761 Sparks, T. C., Thompson, G. D., Kirst, H. A., Hertlein, M. B., Larson, L. L., Worden, T. V., &  
762 Thibault, S. T. (1998). Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect

- 763 control agents, on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Economic**  
764 **Entomology**, 91(6), 1277-1283.
- 765 Sparks, T. C., Crouse, G. D., & Durst, G. (2001). Natural products as insecticides: the biology,  
766 biochemistry and quantitative structure–activity relationships of spinosyns and spinosoids. **Pest**  
767 **management science**, 57(10), 896-905.
- 768 Souza, B. A., Carvalho, C. A. L., & Alves, R. M. O. (2006). Flight activity of *Melipona asilvai*  
769 moure (Hymenoptera: Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, 66(2B), 731-737.
- 770 Stark, J. D., Vargas, R., & Miller, N. (2004). Toxicity of spinosad in protein bait to three  
771 economically important tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae) and their parasitoids  
772 (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Economic Entomology**, 97(3), 911-915.
- 773 Schutze, I. X., Baronio, C. A., Baldin, M. M., Loek, A. E., & Botton, M. (2018). Toxicity and  
774 residual effects of toxic baits with spinosyns on the South American fruit fly. **Pesquisa**  
775 **Agropecuária Brasileira**, 53(2), 144-151.
- 776 Urbaneja, A., Chueca, P., Montón, H., Pascual-Ruiz, S., Dembilio, O., Vanaclocha, P., ... &  
777 Castañera, P. (2009). Chemical alternatives to malathion for controlling *Ceratitis capitata*  
778 (Diptera: Tephritidae), and their side effects on natural enemies in Spanish citrus orchards.  
779 **Journal of economic Entomology**, 102(1), 144-151.
- 780 Vargas, R. I., & Prokopy, R. (2006). Attraction and feeding responses of melon flies and  
781 oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae) to various protein baits with and without toxicants.  
782 **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, 38(1), 49-60.
- 783 Von Frisch, K. (1967) **The dance language and orientation of bees**. Cambridge: Harvard  
784 University Press, 566 p.
- 785 Vontas, J., Hernández-Crespo, P., Margaritopoulos, J. T., Ortego, F., Feng, H. T.,  
786 Mathiopoulou, K. D., & Hsu, J. C. (2011). Insecticide resistance in Tephritid flies. **Pesticide**  
787 **biochemistry and physiology**, 100(3), 199-205.

- 788 Wang, X. G., Jarjees, E. A., McGraw, B. K., Bokonon-Ganta, A. H., Messing, R. H., & Johnson,  
789 M. W. (2005). Effects of spinosad-based fruit fly bait GF-120 on tephritid fruit fly and aphid  
790 parasitoids. **Biological Control**, 35(2), 155-162.
- 791 Witter, S., & Blochtein, B. (2009). **Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio**  
792 **Grande do Sul**. Centro Ecológico Ipê-Serra, Litoral Norte.
- 793 Witter, S., Nunes-Silva, P. (2014). Manual de boas práticas para o manejo e conservação de  
794 abelhas nativas (meliponíneos). Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.
- 795 Witter, S., Nunes-Silva, P., Blochtein, B., Lisboa, B. B., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2014).  
796 **As abelhas e a agricultura**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 143.
- 797

798 **Tabela 1.** Concentração letal média (CL<sub>50</sub> ng i.a./μL de dieta) de formulações de iscas tóxicas  
 799 contendo malationa, expostas via oral à operárias de *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*.

Isca tóxica <sup>1</sup>	Espécie <sup>2</sup>	<i>n</i>	Coefficiente angular±EP	CL <sub>50</sub> * <sup>3</sup> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	<i>P</i>
Anamed	<i>P.e.</i>	540	1,91±0,19	99,45 (90,25 – 108,65)	10,5	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	1,94±0,25	94,45 (90,45 – 98,45)	12,5	<0,0001
Biofruit	<i>P.e.</i>	540	1,42±0,14	55,21 (43,96 – 66,44)	9,62	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	2,66±0,26	75,15 (67,18 – 83,14)	18,45	<0,0001
Flyral	<i>P.e.</i>	540	3,11±0,30	121,71 (111,09 – 132,33)	22,46	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	2,00±0,20	70,00 (58,22 – 81,78)	11,64	<0,0001
Melaço	<i>P.e.</i>	540	2,79±0,32	32,09 (28,52 – 35,67)	17,60	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	2,01±0,21	37,03 (30,79 – 43,28)	11,62	<0,0001
Samaritá	<i>P.e.</i>	540	1,25±0,12	12,28 (9,34 – 15,21)	8,20	<0,0001
Tradicional	<i>T.f.</i>	540	2,39±0,22	16,62 (10,12 – 23,13)	15,61	<0,0001

800 <sup>1</sup>Formulação de isca tóxica composta pelos atrativos alimentares em mistura com o inseticida  
 801 malationa (Malathion® 1000 EC); <sup>2</sup>*P.e.* = *Plebeia emerina*; *T.f.* = *Tetragonisca fiebrigi*;  
 802 <sup>3</sup>Concentração letal 50: concentração de inseticida que causa mortalidade de 50% da população  
 803 (ng i.a./μL de dieta); \*Valores cujos intervalos de confiança (IC 95%) não se sobrepõem são  
 804 considerados significativamente diferentes.

805 **Tabela 2.** Concentração letal média (CL<sub>50</sub> ng i.a./μL de dieta) de formulações de iscas tóxicas  
 806 contendo espinosade, expostas via oral à operárias de *Plebeia emerina* e *Tetragonisca fiebrigi*.

Isca tóxica <sup>1</sup>	Espécie <sup>2</sup>	<i>n</i>	Coefficiente angular±EP	CL <sub>50</sub> * <sup>3</sup> (IC 95%)	χ <sup>2</sup>	<i>P</i>
Anamed	<i>P.e.</i>	540	2,13±0,20	52,86 (42,91 – 62,69)	9,6	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	2,56±0,24	45,65 (39,81 – 51,49)	9,6	<0,0001
Biofruit	<i>P.e.</i>	540	1,81±0,16	39,80 (33,57 – 46,02)	12,53	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	2,02±0,19	39,07 (33,01 – 45,13)	12,64	<0,0001
Flyral	<i>P.e.</i>	540	1,41±0,11	39,76 (32,40 – 47,12)	22,46	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	2,08±0,25	55,08 (46,93 – 63,25)	13,22	<0,0001
Melaço	<i>P.e.</i>	540	2,35±0,23	10,61 (9,30 – 11,93)	15,82	<0,0001
	<i>T.f.</i>	540	2,22±0,22	15,48 (12,82 – 18,15)	11,62	<0,0001
Samaritá	<i>P.e.</i>	540	1,65±0,15	6,92 (4,42 – 9,43)	8,1	<0,0001
Tradicional	<i>T.f.</i>	540	2,01±0,19	4,37 (2,27 – 6,47)	11,37	<0,0001

807 <sup>1</sup>Formulação de isca tóxica composta pelos atrativos alimentares em mistura com o inseticida  
 808 espinosade (Tracer 480 SC<sup>®</sup>); <sup>2</sup>*P.e.* = *Plebeia emerina*; *T.f.* = *Tetragonisca fiebrigi*;  
 809 <sup>3</sup>Concentração letal 50: concentração de inseticida que causa mortalidade de 50% da população  
 810 (ng i.a./μL de dieta); \*Valores cujos intervalos de confiança (IC 95%) não se sobrepõem são  
 811 considerados significativamente diferentes.

812 **Tabela 3.** Número médio ( $\pm$  SE) de forrageiras de *Tetragonisca fiebrigi* se alimentando em  
 813 cada alimentador.

Exp.	Estação	Número de abelhas	Exp.	Estação	Número de abelhas
1	Treinamento	2,90 $\pm$ 0,45	2	Treinamento	4,60 $\pm$ 0,75
	Anamed	0,0 $\pm$ 0,0		Anamed	0,0 $\pm$ 0,0
	Anamed + malationa	0,0 $\pm$ 0,0		Anamed + espinosade	0,0 $\pm$ 0,0
	Controle	0,0 $\pm$ 0,0		Controle	0,0 $\pm$ 0,0
3	Treinamento	4,80 $\pm$ 0,94	4	Treinamento	2,90 $\pm$ 0,45
	Biofruit	0,0 $\pm$ 0,0		Biofruit	0,0 $\pm$ 0,0
	Biofruit + malationa	0,0 $\pm$ 0,0		Biofruit + espinosade	0,0 $\pm$ 0,0
	Controle	0,0 $\pm$ 0,0		Controle	0,0 $\pm$ 0,0
5	Treinamento	2,50 $\pm$ 0,35	6	Treinamento	3,40 $\pm$ 0,36
	Flyral	0,0 $\pm$ 0,0		Flyral	0,0 $\pm$ 0,0
	Flyral + malationa	0,0 $\pm$ 0,0		Flyral + espinosade	0,0 $\pm$ 0,0
	Controle	0,0 $\pm$ 0,0		Controle	0,0 $\pm$ 0,0
7	Treinamento	3,80 $\pm$ 0,38	8	Treinamento	2,70 $\pm$ 0,42
	SamaritaT	0,0 $\pm$ 0,0		SamaritaT	0,0 $\pm$ 0,0
	SamaritaT + malationa	0,0 $\pm$ 0,0		SamaritaT + espinosade	0,0 $\pm$ 0,0
	Controle	0,0 $\pm$ 0,0		Controle	0,0 $\pm$ 0,0
9	Treinamento	2,10 $\pm$ 0,29	10	Treinamento	3,10 $\pm$ 0,25
	Melaço	0,0 $\pm$ 0,0		Melaço	0,0 $\pm$ 0,0
	Melaço + malationa	0,0 $\pm$ 0,0		Melaço + malationa	0,0 $\pm$ 0,0
	Controle	0,0 $\pm$ 0,0		Controle	0,0 $\pm$ 0,0
11	Treinamento	4,20 $\pm$ 0,74	12	Treinamento	2,50 $\pm$ 0,15
	Gelsura	0,0 $\pm$ 0,0		Success	0,0 $\pm$ 0,0
	Controle	0,0 $\pm$ 0,0		Controle	0,0 $\pm$ 0,0

814

815

816 **Tabela 4.** Número médio ( $\pm$  SE) de forrageiras de *Plebeia emerina* atraídas e se alimentando  
 817 em cada alimentador.

Exp.	Alimentador	Número de abelhas	Exp.	Alimentador	Número de abelhas
	Anamed	0,0 $\pm$ 0,0 b*		Anamed	0,0 $\pm$ 0,0 b*
1	Anamed + malationa	0,0 $\pm$ 0,0 b	2	Anamed + espinosade	0,0 $\pm$ 0,0 b
	Controle	93,30 $\pm$ 6,05 a		Controle	84,26 $\pm$ 4,53 a
	Biofruit	0,0 $\pm$ 0,0 b*		Biofruit	0,0 $\pm$ 0,0 b*
3	Biofruit + malationa	0,0 $\pm$ 0,0 b	4	Biofruit + espinosade	0,0 $\pm$ 0,0 b
	Controle	90,20 $\pm$ 6,04 a		Controle	84,09 $\pm$ 4,89 a
	Flyral	0,0 $\pm$ 0,0 b*		Flyral	0,0 $\pm$ 0,0 b*
5	Flyral + malationa	0,0 $\pm$ 0,0 b	6	Flyral + espinosade	0,0 $\pm$ 0,0 b
	Controle	90,19 $\pm$ 6,22 a		Controle	83,82 $\pm$ 5,52 a
	SamaritaT	0,0 $\pm$ 0,0 b*		SamaritaT	0,0 $\pm$ 0,0 b*
7	SamaritaT + malationa	0,0 $\pm$ 0,0 b	8	SamaritaT + espinosade	0,0 $\pm$ 0,0 b
	Controle	90,37 $\pm$ 5,43 a		Controle	83,94 $\pm$ 4,32 a
	Melaço	0,0 $\pm$ 0,0 b*		Melaço	0,0 $\pm$ 0,0 b*
9	Melaço + malationa	0,0 $\pm$ 0,0 b	10	Melaço + malationa	0,0 $\pm$ 0,0 b
	Controle	92,23 $\pm$ 6,27 a		Controle	83,94 $\pm$ 4,32 a
	Gelsura	0,0 $\pm$ 0,0 b <sup>#</sup>		Success	0,0 $\pm$ 0,0 b <sup>#</sup>
11	Controle	92,01 $\pm$ 5,18 a	12	Controle	92,53 $\pm$ 5,77 a

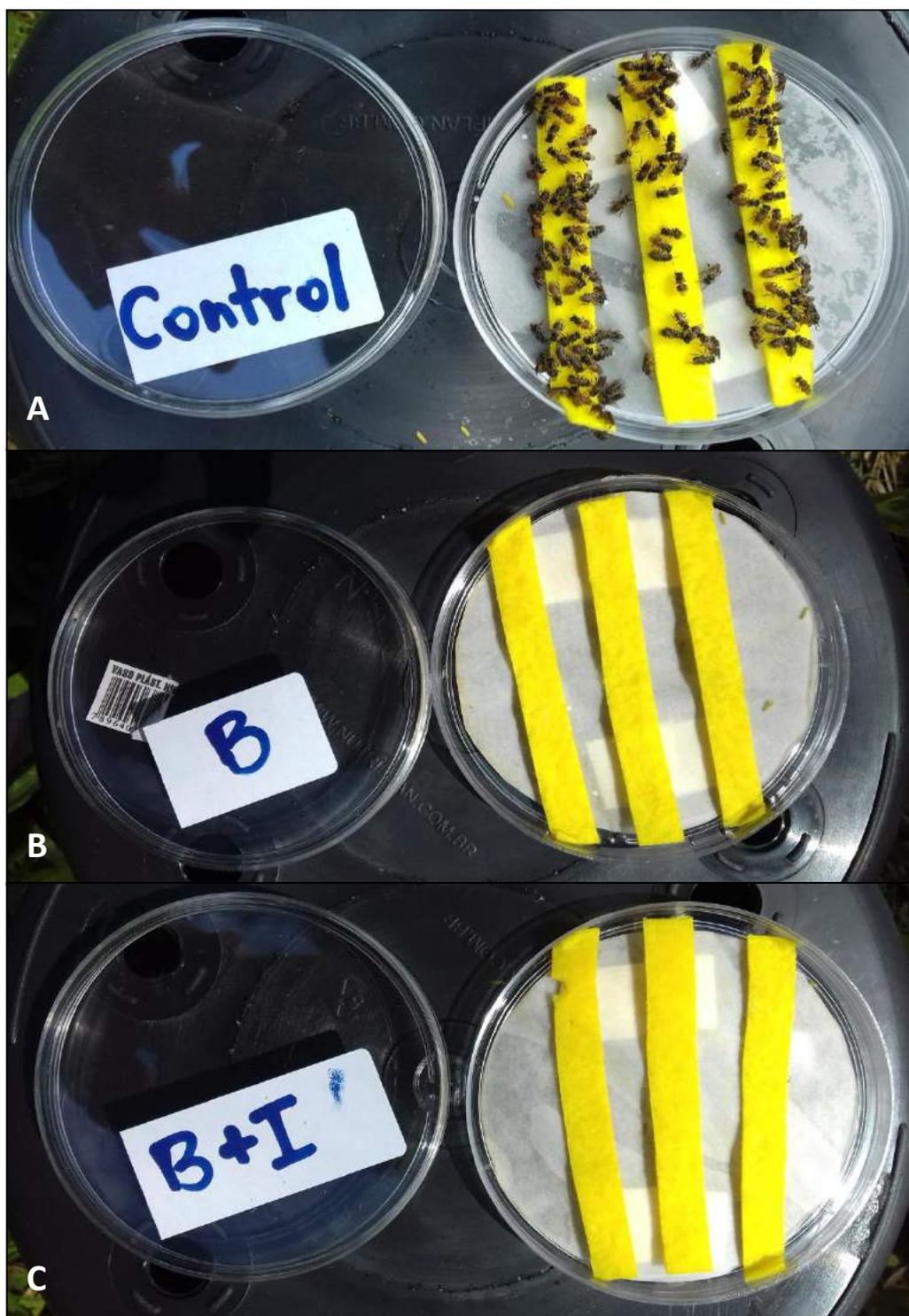
818 \*O número médio de abelhas seguido da mesma letra, em cada experimento, não diferiu  
 819 significativamente usando o teste de Dunn ( $P < 0,05$ ). <sup>#</sup>O número médio de abelhas seguido da  
 820 mesma letra, em cada experimento, não diferiu significativamente pelo teste de Wilcoxon ( $P$   
 821  $< 0,05$ ).

822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833



834 **Figura 1.** Estações de treinamento de abelhas sem ferrão. (A) Estações sobre baldes de plástico.  
835 (B) Detalhes: papel de filtro para essência, recipiente de armazenamento de sacarose e placa de  
836 acrílico contendo ranhuras para alimentação de abelhas. (C) Forrageiras de *P. emerina* se  
837 alimentando.  
838

839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858

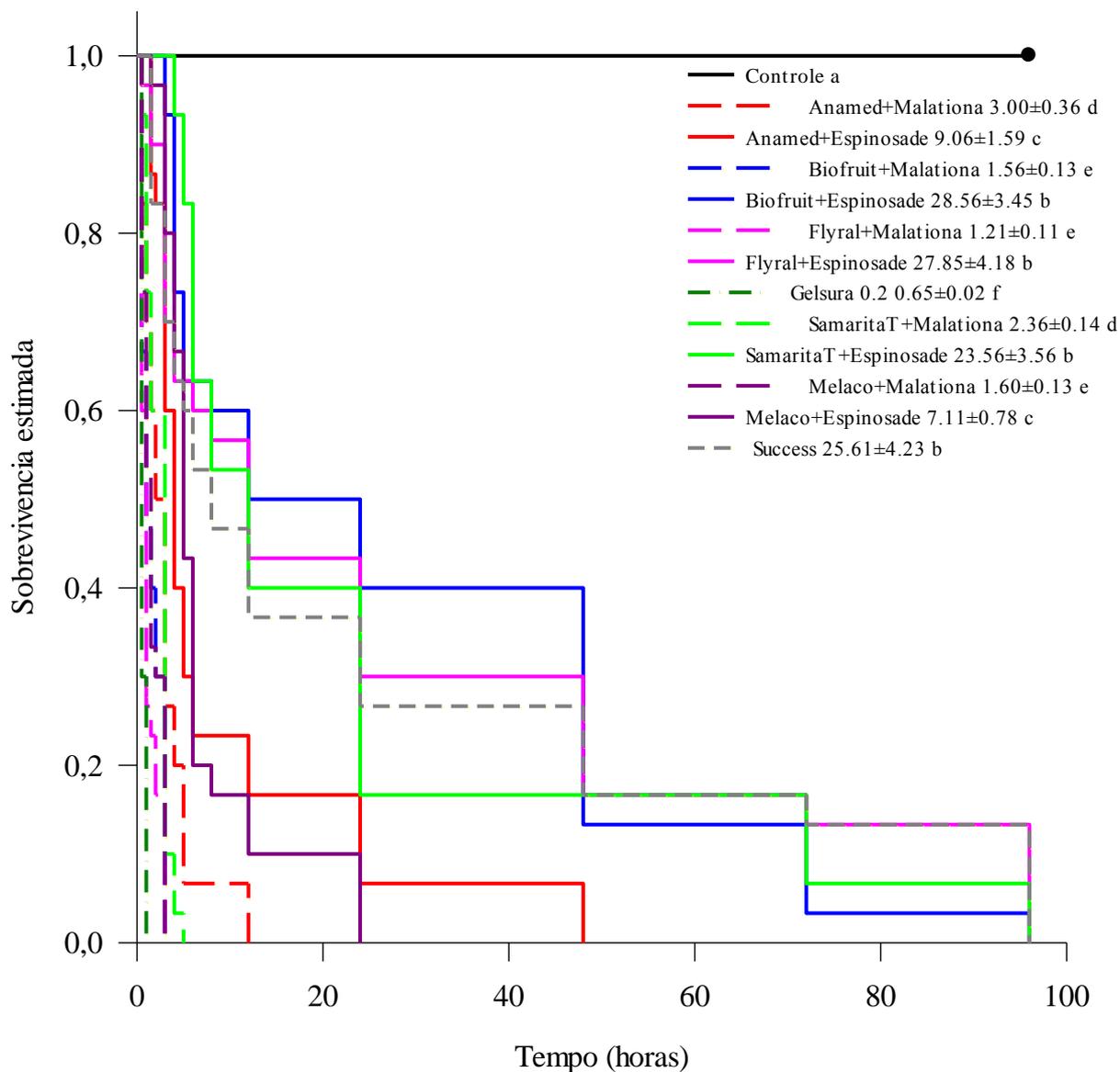


859 **Figura 2.** Placas utilizadas para o teste de atratividade de iscas tóxicas ao forrageamento de  
860 *Plebeia emerina*. (A) Placa contendo o controle, sacarose (50% v/v). (B) Placa contendo  
861 atrativo sem inseticida. (C) Placa contendo atrativo com inseticida.  
862

863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883



884 **Figura 3.** Placas utilizadas para o teste de repelência de iscas tóxicas ao forrageamento de  
885 *Plebeia emerina*. (A) Placa contendo o controle, água destilada. (B) Placa contendo atrativo  
886 Flyral<sup>®</sup> sem inseticida. (C) Placa contendo atrativo Anamed<sup>®</sup> sem inseticida.  
887

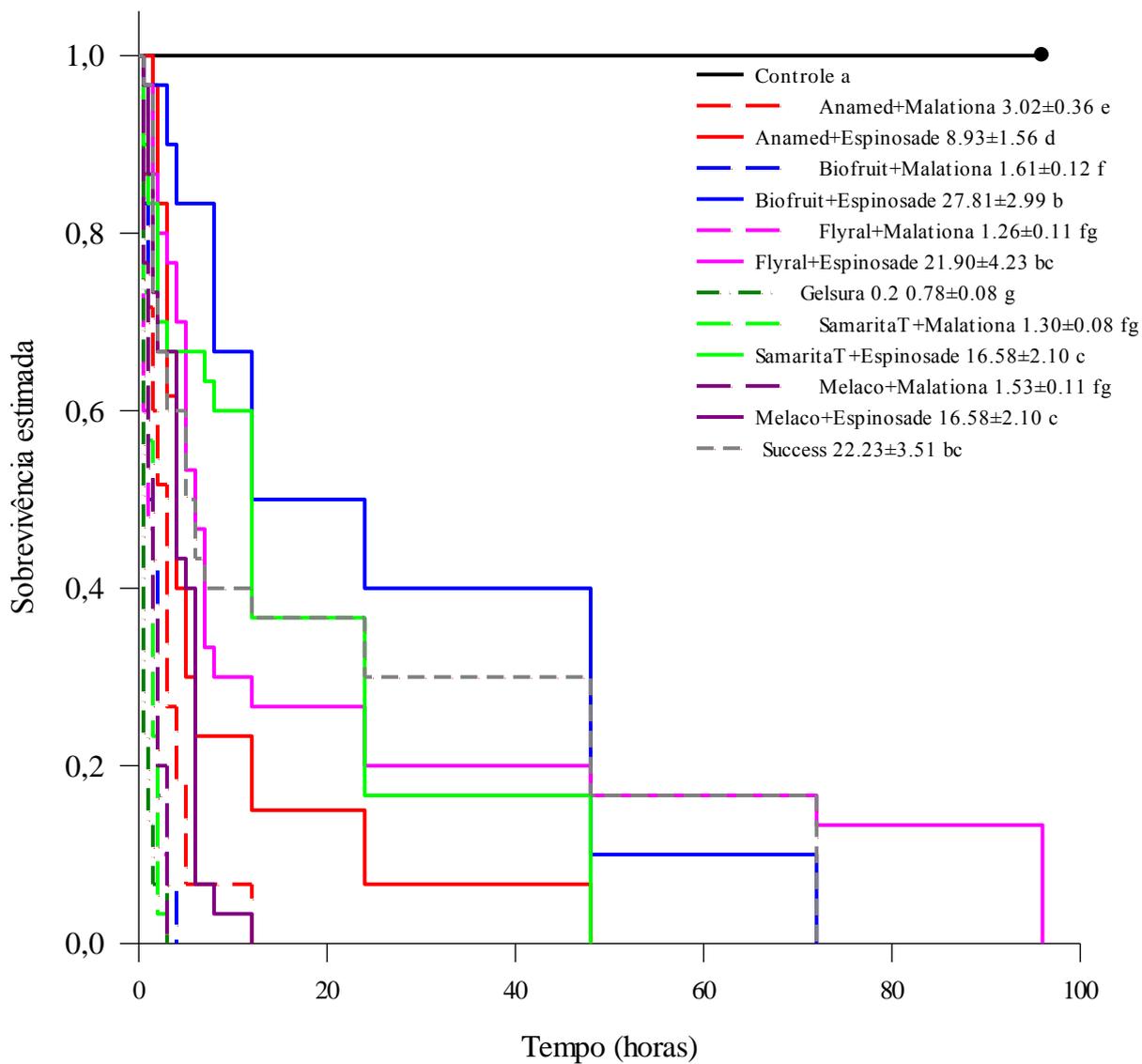


888  
889

890 **Figura 4.** Curvas de sobrevivência de operárias de *Plebeia emerina* expostas oralmente às  
891 formulações de iscas tóxicas.

892 \*O tempo médio de sobrevivência seguido pela mesma letra minúscula não diferiu  
893 significativamente usando o teste de Holm-Sidak ( $P < 0,05$ ).

894

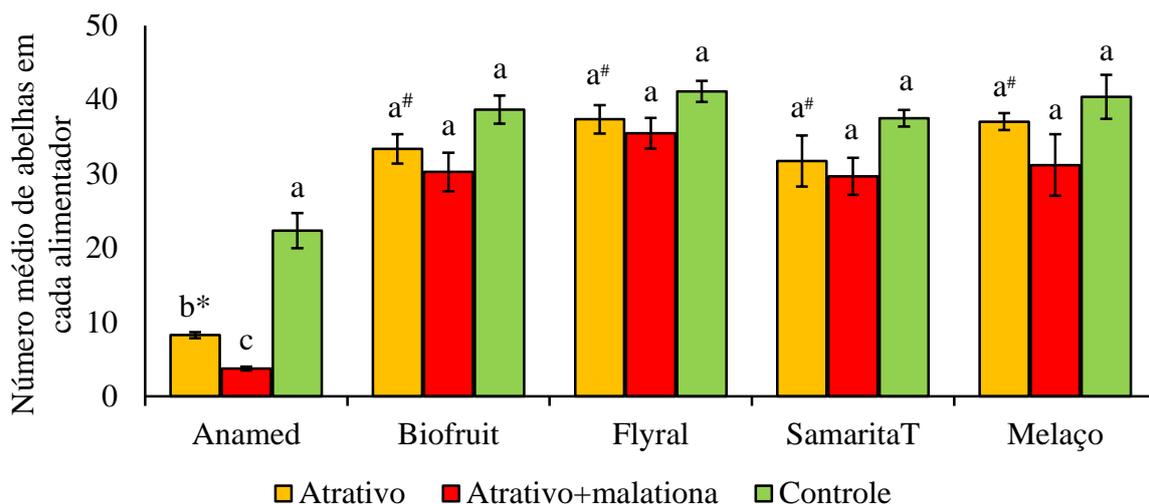


895  
896

897 **Figura 5.** Curvas de sobrevivência de operárias de *Tetragonisca fiebrigi* expostas oralmente às  
898 formulações de iscas tóxicas.

899 \*O tempo médio de sobrevivência seguido pela mesma letra minúscula não diferiu  
900 significativamente usando o teste de Holm-Sidak ( $P < 0,05$ ).

901



902

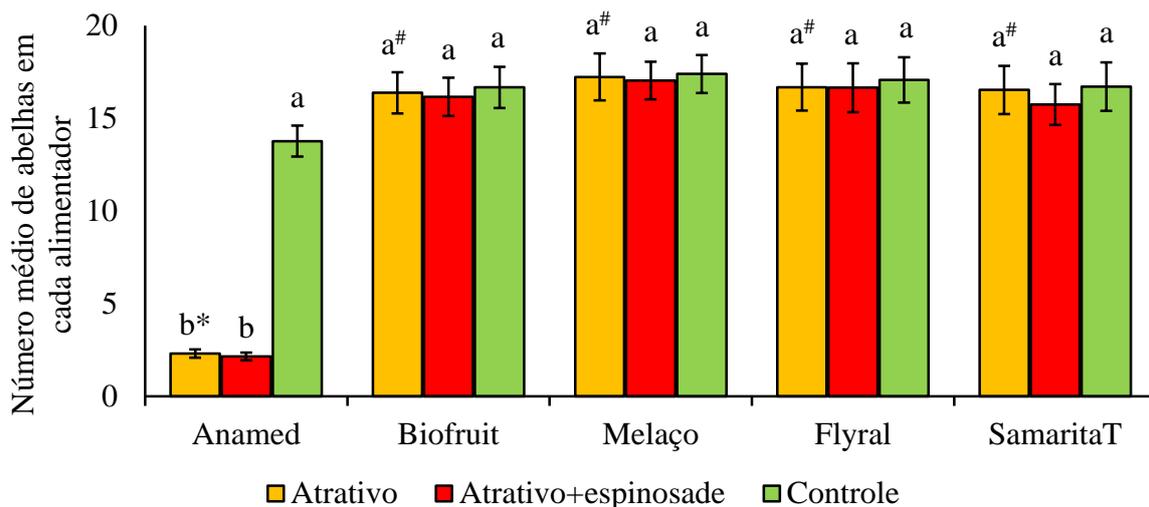
903 **Figura 6.** Repelência de atrativos alimentares e formulações de iscas tóxicas a base de  
 904 malationa ao forrageamento de *Plebeia emerina*.

905 \*O número médio de abelhas seguido da mesma letra, no grupo, não diferiu significativamente

906 usando o teste de Dunn ( $P < 0,05$ ). #O número médio de abelhas seguido pela mesma letra, no

907 grupo, não diferiu significativamente usando o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

908

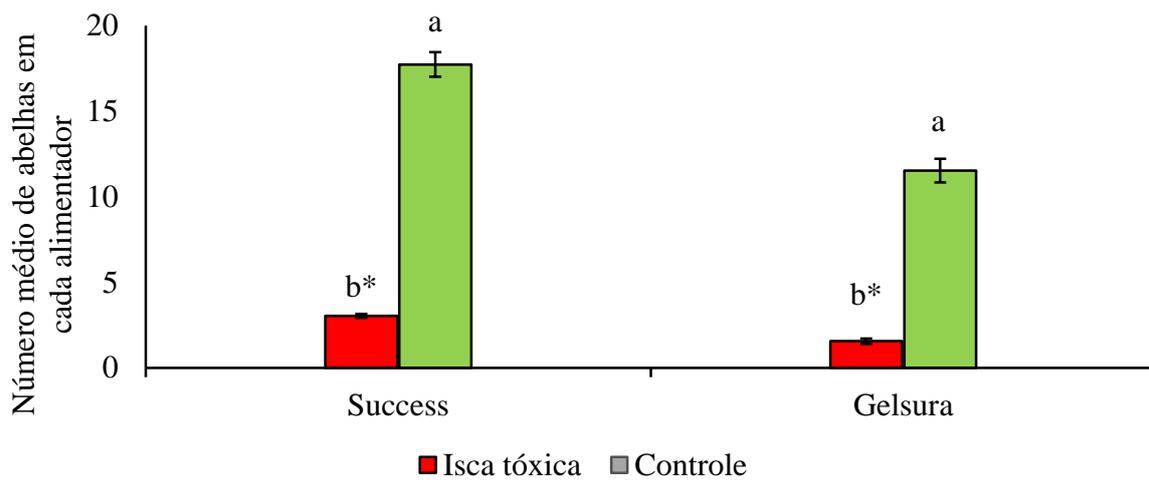


909

910 **Figura 7.** Repelência de atrativos alimentares e formulações de iscas tóxicas a base de  
 911 espinosade ao forrageamento de *Plebeia emerina*.

912 \*O número médio de abelhas seguido da mesma letra, no grupo, não diferiu significativamente  
 913 usando o teste de Dunn ( $P < 0,05$ ). #O número médio de abelhas seguido pela mesma letra, no  
 914 grupo, não diferiu significativamente usando o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

915



916

917 **Figura 8.** Repelência de iscas tóxicas de pronto uso ao forrageamento de *Plebeia emerina*.

918 \*O número médio de abelhas seguido da mesma letra, em cada grupo, não diferiu

919 significativamente pelo teste de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ).

920

## 5. Considerações finais

Existe uma preocupação crescente em relação aos efeitos deletérios dos inseticidas sobre as abelhas melíferas e nativas no Brasil e no mundo, entretanto, há uma carência de trabalhos relacionados às abelhas sem ferrão brasileiras, especialmente as espécies *P. emerina* e *T. fiebrigi*.

Experimentos de laboratório permitiram conhecer a toxicidade aguda letal dos inseticidas acetamiprido, malationa, fosmete e espinosade, através de duas vias de exposição: oral e tópica. No estudo, foi demonstrado a alta toxicidade de espinosade sobre as operárias de *P. emerina* e *T. fiebrigi*, enquanto que, acetamiprido, quando comparado com os demais inseticidas apresentou menor toxicidade, sendo a concentração utilizada em campo deste inseticida 52,55 vezes menor que a CL<sub>50</sub> para *P. emerina* e 123,01 vezes menor que a CL<sub>50</sub> para *T. fiebrigi*.

Nos estudos que avaliaram o efeito subletal de acetamiprido, fosmete, malationa e espinosade sobre operárias e forrageiras de *P. emerina* e *T. fiebrigi* foi evidenciado que, apesar da menor toxicidade aguda letal observada para acetamiprido, doses subletais desse inseticida afetam a atividade locomotora, a capacidade de voo. Assim como, o reconhecimento do alimento das abelhas, podendo causar efeitos negativos ao longo do tempo em colônias. Estes fatores podem prejudicar diretamente as operárias na realização das tarefas para o perfeito funcionamento da colmeia. Também, observou-se que os demais inseticidas causaram efeitos negativos na atividade locomotora, de voo e no reconhecimento do alimento das abelhas testadas.

Com os resultados encontrados no presente estudo, além de fornecer informações sobre os principais inseticidas químicos utilizados para o manejo de

moscas-das-frutas no Brasil sobre duas espécies de abelhas nativas sem ferrão, proporcionou o desenvolvimento de metodologias de bioensaios que podem ser usadas para avaliar o efeito de produtos químicos que são utilizados no manejo de pragas agrícolas. Ademais, o trabalho demonstra a importância de considerar outras espécies de abelhas nas avaliações de risco, não apenas *A. mellifera* que, atualmente, é considerada referência para os estudos toxicológicos. Entretanto, mais estudos de semi-campo e campo são necessários para investigar os impactos desses produtos em condições reais, visando a preservação da ação dos polinizadores no momento do controle de pragas.

A exposição de operárias adultas de *P. emerina* e *T. fiebrigi* às formulações de iscas tóxicas contendo os agentes letais malationa e espinosade demonstrou a alta suscetibilidade dessas espécies a tais compostos. Além disso, os atrativos alimentares associados ao inseticida espinosade mostraram maior toxicidade via ingestão às abelhas em relação à associação ao inseticida malationa. Também, foi possível verificar que melado de cana-de-açúcar e Samaritá Tradicional<sup>®</sup>, associados aos inseticidas espinosade e malationa, apresentaram os menores valores de CL<sub>50</sub> quando comparados aos demais atrativos testados.

Nos experimentos de campo, foi possível registrar que nenhuma formulação de isca tóxica foi atrativa às operárias de *P. emerina*, além disso, as formulações Anamed<sup>®</sup> (com malationa e espinosade), Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup> (ambas de pronto uso) foram repelentes ao forrageio de *P. emerina*. Entretanto, a metodologia utilizada nos testes de campo não se mostrou eficiente para avaliar a atratividade e repelência das formulações de iscas tóxicas sobre as forrageiras de *T. fiebrigi*. Por esse motivo, conclui-se que as diferentes espécies de abelhas respondem de forma diferente cada metodologia e que são necessários estudos para o desenvolvimento de novas metodologias de campo para esta espécie.

Apesar das formulações de iscas tóxicas apresentarem toxicidade elevada para as abelhas sem ferrão *P. emerina* e *T. fiebrigi* em laboratório, considera-se que o emprego dessas formulações para o manejo de moscas-das-frutas em pomares é uma estratégia viável e segura, visto que não foram atrativas às forrageiras de *P. emerina* sendo que as formulações Anamed<sup>®</sup> (com malationa e espinosade), Gelsura<sup>®</sup> e Success<sup>®</sup> (ambas de pronto uso) foram repelentes à espécie.

O presente trabalho pode ser utilizado como base para que estudos posteriores para outras espécies de apidae, que levem em consideração os efeitos dos inseticidas a nível celular e molecular, sejam realizados em polinizadores nativos.

## Referências

- ALKASSAB, A. T.; KIRCHNER, W. H. Assessment of acute sublethal effects of clothianidin on motor function of honeybee workers using video-tracking analysis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.147, p.200-205, 2018.
- ALMEIDA, C. O. Fruticultura brasileira em análise. **Jornal da fruta**. Ano XVI, n. 203, Lages, SC, 2008.
- ALSTON, D. G.; TEPEDINO, V. J.; BRADLEY, B. A.; TOLER, T. R.; GRISWOLD, T. L.; MESSINGER, S. M. Effects of the insecticide phosmet on solitary bee foraging and nesting in orchards of Capitol Reef National Park, Utah. **Environmental Entomology**, v. 36, n. 4, p. 811-816, 2007.
- ATKINS, E. L. Injury to honey bees by poisoning. In: Graham, J.M. (Ed.), **The Hive and the Honey Bee**, Dadant and Sons, Hamilton, IL, p.1153-1208, 1998.
- BAILEY, J.; SCOTT-DUPREE, C.; HARRIS, R.; TOLMAN, J.; HARRIS, B. Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. **Apidologie**, v. 36, n. 4, p. 623-633, 2005.
- BECHER, M. A.; OSBORNE, J. L.; THORBEEK, P.; KENNEDY, P. J.; GRIMM, V. Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 868-880, 2013.
- BORGES, R.; MACHOTA JR, R.; BOFF, M.I.C.; BOTTON, M. Efeito de iscas tóxicas sobre *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). **Bioassay**, v.10, n.3, 2015.

BOTTON, M.; ARIOLI, C. J.; MACHOTA-JÚNIOR, R.; NUNES, M. Z.; ROSA, J. M. Moscas-das-frutas na fruticultura de clima temperado: situação atual e perspectivas de controle através do emprego de novas formulações de iscas tóxicas e da captura massal. **Agropecuária Catarinense**, v.29, p. 103-107, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrofit**, 2018. [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em 05 dez 2018.

BROOHAERTS, W.; VAN NERUM, I.; KEULEMANS, J. Update on and review of the incompatibility (S-) genotypes of apple cultivars. **HortScience**, v.39, n.5, p.943-947, 2004.

CABRERA-MARÍN, N. V.; LIEDO, P.; SÁNCHEZ, D. The effect of application rate of GF-120 (Spinosad) and Malathion on the mortality of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) foragers. **Journal of economic entomology**, v.109, n.2, p.515-519, 2016.

CARVALHO, S.M.; CARVALHO, G.A.; CARVALHO, C.F.; BUENO FILHO, J.S.S.; BAPTISTA, A.P.M. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.4, p.597-606, 2009.

CASTILHOS, R. V.; GRÜTZMACHER, A. D.; NAVA, D. E.; ZOTTI, M. J.; SIQUEIRA, P. R. B.; SPAGNOL, D. Selectivity of pesticides used in peach orchards on the larval stage of the predator *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera: Chrysopidae). **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.6 Sup 1, p.3585-3596, 2013.

CASTILHOS, R. V.; GRÜTZMACHER, A. D.; NEVES, M. B. D.; MORAES, Í. L. D.; GAUER, C. J. Selectivity of insecticides used in peach farming to larvae of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) in semi-field conditions. **Revista Caatinga**, v.30, n.1, p.109-115, 2017.

CHUECA, P.; MONTÓN, H.; RIPOLLÉS, J.L.; CASTAÑERA, P.; MOLTÓ, E.; URBANEJA, A. Spinosad bait treatments as alternative to malathion to control the mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in the Mediterranean Basin. **Journal of Pesticide Science**, v.32, n.4, p.407-411, 2007.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D.W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, v.37, p.275-292, 2006.

COSTA, E.M.; ARAUJO, E.L.; MAIA, A.V.; SILVA, F.E.; BEZERRA, C.E.; SILVA, J.G. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie**, v.45, n.1, p.34-44, 2014.

DAI, P., JACK, C.J., MORTENSEN, A.N.; ELLIS, J.D. Acute toxicity of five pesticides to *Apis mellifera* larvae reared in vitro. **Pest Management Science**, v.73, n.11, p. 2282-2286, 2017.

DELAPLANE, K. S., MAYER, D. F. **The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000 - crop pollination by bees**. CABI Publishing, New York, 2000.

DELAPLANE, K. S.; MAYER, D. F. **Crop pollination by bees**. Oxon: CABI Publishing, 344p., 2005.

DEL SARTO, M.C.L.; OLIVEIRA, E.E.; GUEDES, R.N.C.; CAMPOS, L.A.O. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v.45, n.5, p.626-636, 2014.

DESNEUX, N. D.; DECOURTYE, A.; DELPUECH J. M. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review Entomology**. v.52, p.81-106, 2007.

DEVILLERS, J.; PHAM-DELEGUE, M.H.; DECOURTYE, A.; BUDZINSKI, H.; CLUZEAU, S.; MAURIN, G. Structure-toxicity modeling of pesticides to honey bees. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v.13, n.7-8, p.641-648, 2002.

DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: **Honey Bees**. CRC Press, p. 70-80, 2003.

DÍAZ-FLEISCHER, F.; PÉREZ-STAPLES, D.; CABRERA-MIRELES, H.; MONTOYA, P.; LIEDO, P. Novel insecticides and bait stations for the control of *Anastrepha* fruit flies in mango orchards. **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 3, p. 865-872, 2017.

DORNELES, A. L.; ROSA, A. de S.; BLOCHTEIN, B. Toxicity of organophosphorus pesticides to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, v. 48, n. 5, p. 612-620, 2017.

DOS SANTOS, C. F.; COSTA, A. L.; DORNELES, A. L.; SANTOS, P. D. S. dos; BLOCHTEIN, B. Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. **Scientific Reports**, v. 6, p. 31605, 2016.

ELTZ, T.; BRÜHL, C.A.; GÖRKE, C. Collection of mold (*Rhizopus* sp.) spores in lieu of pollen by the stingless bee *Trigona collina*. **Insectes sociaux** v.49, p.28-30. 2002.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: FREITAS, B.M.; PEREIRA, J.O.P. **Solitary bees: Conservation, Rearing and Management for Pollination**, p.19-25, 2004.

FAO. **Faostat Database Agrostat**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>>. (Acessado dez. 2018). 2018.

FELTON, J.C.; OOMEN, P. A.; STEVENSON, J.H. Toxicity and Hazard of pesticides to honeybees: Harmonization of test methods. **Bee World**, v.67, p.114-124, 1986.

FLORES, S.; GÓMEZ, E.; CAMPOS, S.; GÁLVEZ, F.; TOLEDO, J.; LIEDO, P.; MONTOYA, P. Evaluation of mass trapping and bait stations to control *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) fruit flies in mango orchards of Chiapas, Mexico. **Florida Entomologist**, v. 100, n. 2, p. 358-366, 2017.

GARY, N.E.; MUSSEN, E.C. Impact of Mediterranean fruit fly malathion bait spray on honey bees. **Environmental Entomology**, v.13, p.711–717, 1984.

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO, E. A.; VEIGA, A. K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v.46, n.2, p.209-223, 2015a.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.108, n.3, p.849-857, 2015b.

GARRATT, M. P.; BREEZE, T. D.; JENNER, N.; POLCE, C.; BIESMEIJER, J. C.; POTTS, S. G. Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.184, p.34-40, 2014.

GODFRAY, H. C. J.; BLACQUIERE T.; FIELD L. M.; HAILS, R. S.; PETROKOFISKY, G.; POTTS, S. G.; RAINE, N. E.; VANBERGEN, A. J.; MCLEAN, A. R. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1786, p. 20140558, 2014.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1255957, 2015.

GUEDES, R. N. C.; SMAGGHE, G.; STARK, J. D.; DESNEUX, N. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. **Annual review of entomology**, v. 61, p. 43-62, 2016.

HÄRTER, W. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; NAVA, D. E.; GONÇALVES, R. S.; BOTTON, M. Isca tóxica e disrupção sexual no controle da mosca-das-frutas sul-americana e da mariposa-oriental em pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.229-235, 2010.

HÄRTER, W. R.; BOTTON, M.; NAVA, D. E.; GRUTZMACHER, A. D.; GONÇALVES, R. S.; JUNIOR, R. M.; BERNARDI, D.; ZANARDI, O. Z. Toxicities and Residual Effects of Toxic Baits Containing Spinosad or Malathion to Control the Adult *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v.98, n.1, p.202–208, 2015.

HEARD, T. A.; The role of stingless bees in crop pollination. **Annual review of entomology**, v.44, n.1, p.183-206, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**, 2017. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/> (Acessado dez. 2018).

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; DE JONG, D. Bees as pollinators in Brazil. In: **Workshop on São Paulo Declaration on Pollinators plus 5 Forum**, São Paulo, Brasil, Holos Editora. 2006.

IPBES. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. In: POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO HT (eds). **Secretaria of the**

**Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**, Bonn. 552p. 2016.

IWASA, T.; MOTOYAMA, N.; AMBROSE, J.T.; ROE, R.M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, v.23, n.5, 371-378, 2004.

JOHNSON, R.M. Honey bee toxicology. **Annual review of entomology**, v.60, p.415-434, 2015.

JUNQUEIRA, C. N.; AUGUSTO, S. C. Bigger and sweeter passion fruits: effect of pollinator enhancement on fruit production and quality. **Apidologie**, v.48, n.2, p.131-140, 2017.

KARISE, R.; VIIK, E.; MÄND, M. Impact of alpha cypermethrin on honey bees foraging on spring oilseed rape (*Brassica napus*) flowers in field conditions. **Pest Management Science**, v.63, n.11, p.1085-1089, 2007.

KEVAN, P. G.; BAKER, H. G. Insects as flower visitors and pollinators. **Annual review of entomology**, v.28, n.1, p.407-453, 1983.

KLATT, B. K.; BURMEISTER, C.; WESTPHAL, C.; TSCHARNTKE, T.; VON FRAGSTEIN, M. Flower volatiles, crop varieties and bee responses. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e72724, 2013.

KLEIN, A. M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B: biological sciences**, v.274, n.1608, p. 303-313, 2007.

KOVALESKI, A.; SUGAYAMA, R. L.; URAMOTO, K.; MALAVASI, A. Rio Grande do Sul. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, p. 285-290, 2000.

MAGALHÃES, T. L.; VENTURIERI, G. C. **Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no nordeste paraense**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2010.

MEDRZYCKI, P.; GIFFARD, H.; AUPINEL, P.; BELZUNCES, L.P.; CHAUZAT, M.P.; CLABEN, C.; LE CONTE, Y. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v.52, n.4, p.1-60, 2013.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. 2nd edn. Johns Hopkins, Baltimore, 2007.

MICHENER, C. D. The meliponini. In **Pot-honey**, Springer, New York, 2013.

NAVA, D. E.; BOTTON, M. **Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em pessegueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 29p. (Documentos, 315). 2010.

NESTEL, D., NEMNY-LAVY, E., ZILBERG, L., WEISS, M., AKIVA, R., GAZIT, Y. The fruit fly PUB: a phagostimulation unit bioassay system to quantitatively measure ingestion of baits by individual flies. **Journal of Applied Entomology**. v.128, p.576-582, 2004.

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

NONDILLO, A.; ZANARDI, O. Z.; AFONSO, A.; BENEDETTI, A.; BOTTON, M. Efeito de inseticidas neonicotinóides sobre a mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na cultura da videira. **Bioassay**, v.2, p.1-9, 2007.

NORA, I.; HICKEL, E. Pragas da macieira: dípteros e lepidópteros. In: EPAGRI (Ed.). **A cultura da macieira**. Florianópolis: GMC/Epagri, cap.15, p. 463-486. 2006.

NUNES-SILVA, P.; ROSA, J.M. da; WITTER, S.; SCHLEMMER, L.M.; HALINSKI, R.; RAMOS, J.D.; ARIOLI, C.J.; BLOCHTEIN, B.; BOTTON, M. **Visitantes florais e potenciais polinizadores da cultura da macieira**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 16p., 2016. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado Técnico, 184).

OECD. Guidelines for the testing of chemicals number 213, Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, OECD. **Environmental Health and Safety Division**, Paris. 1998a.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals number 214, Honeybees, Acute Contact Toxicity Test, OECD. **Environmental Health and Safety Division**, Paris. 1998b.

OEPP/EPPO. Revised draft of EPPO Guidelines PP 1/170: Guidelines for the efficacy evaluation of plant protection products: side effects on honeybees. Appendix 1, In: Belzunces L. P., Pélissier, C., Lewis G. B. (Eds.), Hazards of pesticides to bees, **Volloques de l' INRA**, Paris, p. 279-288, 2001.

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

ORTH, A. I. Levantamento das abelhas nativas (Hym., Apoidea) associadas às flores de macieira ('*Pyrus malus* L.'). **Anais do VI Congresso Brasileiro de Apicultura**, Florianópolis, p. 280-287, 1984.

ORTOLAN, S. M. L. S.; LAROCCA, S. Melissocenótica em áreas de cultivo de macieira (*Pyrus malus* L.) em Lages (Santa Catarina), com notas comparativas e experimento de polinização com *Plebeia emerina* (Friese) (Hymenoptera, Apoidea). **Acta Biológica Paranaense**, v. 25, p. 1-113, 1996.

PATRON, E. Polinización com abejas. In: BESSONE, J.F. (Ed.). Editorial Campo & Abejas – Edición especial: **Polinización**. Buenos Aires: Agencia Periodística CID, p.4-15, 2010.

PAUDEL, Y. P.; MACKERETH, R.; HANLEY, R.; QIN, W. Honey bees (*Apis mellifera* L.) and pollination issues: Current status, impacts, and potential drivers of decline. **Journal of Agricultural Science**, v. 7, n. 6, p. 93, 2015.

PETRI, J. L.; HAWERROTH, F. J.; LEITE, G. B. Fenologia de espécies silvestres de macieira como polinizadora das cultivares Gala e Fuji. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.4, p.868-874, 2008.

PIOVESAN, B. Inventário de visitantes florais na cultura do morangueiro e efeitos de inseticidas sobre as abelhas nativas *Melipona quadrifasciata* e *Tetragonisca fiebrigi*. **Dissertação** - Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, 106p., 2018.

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

- POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v.25, n.6, p.345-353, 2010.
- RAGA, A.; SATO, M. E. Time-mortality for fruit flies (Diptera: Tephritidae) exposed to insecticides in laboratory. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.1, p.73-77, 2006.
- RAGA, A.; SATO, M. E. Toxicity of neonicotinoids to *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Plant Protection Research**, v.51, n.4, p.413-419, 2011.
- RAGA, A.; SATO, M. E. **Controle químico de moscas-das-frutas**. Documento Técnico 20, 14p. 2016.
- RIBEIRO, L. G. Manejo das principais pragas da macieira no Brasil. **Agropecuária Catarinense**, v. 23, p. 149-157, 2010.
- ROUBIK, D. W. **Ecology and Natural History of Tropical Bees**. New York, Cambridge University. 514p. 1989.
- ROUBIK, D. W. **The pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners**. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), Roma, 2018.
- RUIZ, L.; FLORES, S.; CANCINO, J.; ARREDONDO, VALLE, J. J.; DÍAZ-FLEISCHER, F. WILLIAMS, T. Lethal and sublethal effects of spinosad-based GF-120 bait on the tephritid parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, v.44, p.296-304, 2008.
- RUIZ, C. B.; S. L. Experiencias en el control de "Batrocera oleae, *Ceratitis capitata*" y otras plagas emergentes, en la zona mediterránea, mediante técnicas de "Attract and Kill". **Phytoma España**, n.254, p.50, 2013.
- SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees—a risk assessment. **PLoS one**, v.9, n.4, p. e94482, 2014.
- SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Impacts of pesticides on honey bees. In: **Beekeeping and Bee Conservation-Advances in Research**. InTech, 2016.

SCOZ, P. L.; BOTTON, M.; GARCIA, M. S. Chemical control of *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) in laboratory. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1689-1694, 2004.

SIVITER, H.; KORICHEVA, J.; BROWN, M. J.; LEADBEATER, E. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. **Journal of Applied Ecology**, v.55, n.6, p.2812-2821, 2018.

SLAA, E. J.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; HOFSTEDÉ, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v.37, p.293-315, 2006.

SOARES, H. M.; JACOB, C. R. O.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v.94, n.6, p.675-680, 2015.

STANLEY, J.; SAH, K.; JAIN, S.K.; BHATT, J.C.; SUSHIL, S.N. Evaluation of pesticide toxicity at their field recommended doses to honeybees, *Apis cerana* and *A. mellifera* through laboratory, semi-field and field studies. **Chemosphere**, v.119, p.668-674, 2015.

STARK, J. D.; VARGAS, R.; MILLER, N. Toxicity of spinosad in protein bait to three economically important tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae) and their parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). **Journal Economic Entomology**, v.97, p.911-915, 2004.

THOMPSON, G. D.; DUTTON, R.; SPARKS, T. C. Spinosad—a case study: an example from a natural products discovery programme. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v.56, n.8, p.696-702, 2000.

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

TOSI, S.; BURGIO, G.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific reports**, v.7, n.1, p.1201, 2017.

URBANEJA A.; CHUECA, P.; MONTÓN. H.; PASCUAL-RUIZ. S.; DEMBILIO, O. Chemical alternatives to malathion for controlling *Ceratitis capitata* (Diptera:

Tephritidae), and their side effects on natural enemies in Spanish citrus orchards. **Journal of Economic Entomology**, v.102, p.144-151. 2009.

VENTURIERI, G. C.; ALVES, D. A.; VILLAS-BÔAS, J. K.; CARVALHO, C. A.; MENEZES, C. Meliponicultura no Brasil: Situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização, In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., CANHOS, D. A. L.; SARAIVA, A. M. **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. EDUSP, São Paulo, 2011.

VILLAVERDE, J. J.; SEVILLA-MORÁN, B.; SANDÍN-ESPAÑA, P.; LÓPEZ-GOTI, C.; ALONSO-PRADOS, J. L. Biopesticides in the framework of the European Pesticide Regulation (EC) No. 1107/2009. **Pest management science**, v.70, n.1, p.2-5, 2014.

WIEST, L.; BULETÉA, A.; GIROUDA, B.; FRATTAA, C.; AMICA, S.; LAMBERTB, O.; POULIQUENB, H.; ARNAUDGUILHEMA, C. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.1218, n.34, p.5743-5756, 2011.

WITTER, S.; BLOCHTEIN, B. **Espécies de abelhas sem ferrão de ocorrência no Rio Grande do Sul**. Centro Ecológico Ipê-Serra, Litoral Norte, 2009.

WITTER, S.; NUNES-SILVA, P.; BLOCHTEIN, B.; LISBOA, B.B.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. **As abelhas e a agricultura**, Porto Alegre: EDIPUCRS, 143p., 2014.

WITTER, S.; NUNES-SILVA, P.; LISBOA, B.B.; TIRELLI, F.P.; SATTLER, A.; BOTH HILGERT-MOREIRA, S.; BLOCHTEIN, B. Stingless bees as alternative pollinators of canola. **Journal of economic entomology**, v.108, n.3, p. 880-886, 2015.