

RENATA CUNHA PEREIRA

**SELETIVIDADE DE EXTRATOS BOTÂNICOS ÀS ABELHAS *Partamona
helleri* E *Apis mellifera***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2016

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

T

Pereira, Renata Cunha, 1991-

P436s
2016

Seletividade de extratos botânicos às abelhas *Partamona helleri* e *Apis mellifera* / Renata Cunha Pereira. – Viçosa, MG, 2016.

ix, 20f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Flávio Lemes Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.17-20.

1. Abelhas - Efeito de inseticidas vegetais. 2. Extratos vegetais - Atividade inseticida. 3. Ecologia agrícola. 4. Abelhas - Alimentação. 5. Abelhas - Respiração. 6. Inseto – Voo. 7. Polinizadores . I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-graduação em Agroecologia. II. Título.

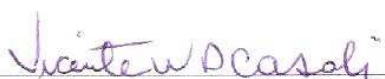
CDD 22. ed. 595.799

RENATA CUNHA PEREIRA

SELETIVIDADE DE EXTRATOS BOTÂNICOS ÀS ABELHAS *Partamona helleri* E *Apis mellifera*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, para obtenção do título de Magister Scientiae.

APROVADA: 11 de janeiro de 2016.



Vicente Wagner Dias Casali



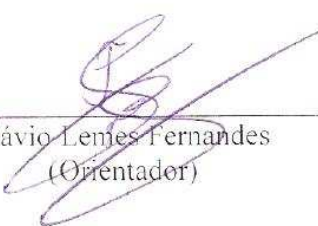
Flávia Monteiro Coelho Ferreira



Maria Elísia de Sena Fernandes



Maria Augusta Lima Siqueira
(Coorientadora)



Flávio Lemes Fernandes
(Orientador)

*Ao meu papai (presente mesmo que em outro
plano) e minha mamãe,
instrumentos de amor e incentivo.
Toda minha gratidão por tudo que fizeram e
fazem por mim. Essa conquista é de vocês!*

Dedico

“A percepção do ambiente e dos organismos pelas comunidades tradicionais, é diferente daquela que a ciência tem. Essa percepção só pode ser estudada através de métodos que sejam capazes de fazer a ponte entre dois universos: o conhecimento popular e o conhecimento científico.”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Ao Deus presente em meu coração. Que me acalenta nos momentos difíceis e renova minhas forças e esperança. Que colocou em meu caminho pessoas de luz, as quais venho prestar meu mais sincero agradecimento.

Minha mamãe, que é a maior incentivadora dos meus sonhos e que não mede esforços para que eu possa realiza-los. Me faltam palavras para expressar meu amor e gratidão por você. Ao meu papai, que pôde me oferecer um amor gigante. Que se foi tão no início dessa etapa, mas que me conta em sonhos o quanto se orgulha de mim. Nunca vou esquecer suas últimas palavras “Deus te abençoe minha filha”, e é isso que Deus e o senhor estão fazendo aí do Céu. Papai e mamãe, vocês são meus grandes tesouros.

Aos meus, tios e tias, primos e primas, afilhados obrigada pela presença e carinho, vocês são os melhores do mundo. Desculpem minha ausência, mas no meu coração vocês estão sempre presentes.

Ao Junin que está ao meu lado sempre, oferecendo seu apoio nos momentos mais difíceis e aquele abraço aconchegante. Que junto comigo, celebra as conquistas e vitórias. Aquele que acompanhou cada etapa desse projeto, cada madrugada no laboratório, mostrando que além de um grande parceiro na pesquisa é um companheiro para toda a vida. Ao José Olívio, Rosimar, Ítalo e Nath, vocês são aquelas pessoas que o coração escolhe. Gratidão pela presença de vocês em minha vida.

A minha segunda família, pessoas pelas quais tenho um amor gigante: Antônio, Solange, Érica e Letícia, amo muito vocês. E ao Silvério, Ilda, Renata e Rafaela, toda minha gratidão.

Aos verdadeiros amigos, vocês sabem que estou falando de vocês. Obrigada pela amizade, por fazerem parte da minha vida e tornarem meus dias mais felizes. E Carol, Suh e Maria, vocês são as irmãs chatas que a vida me deu, obrigada por todos os momentos juntas.

Aos mestres, desde o primário, até a Pós-Graduação. Em especial a Flávia, pelo apoio e amizade, mas principalmente por despertar em mim a paixão pelas abelhas.

Ao meu orientador Flávio, que aceitou o desafio de me orientar a distância e desempenhou uma função além de orientação. Obrigada por todo carinho, compreensão, incentivo e amizade. Obrigada por contribuir com minha formação de mestre e de ser humano. Agradecer a professora Maria Augusta e ao Pós-Doutorando Wagner por toda orientação, atenção e disponibilidade. Obrigada por sempre me receberem em suas salas com uma vontade enorme em ajudar. Vocês três, em especial, foram brilhantes para a

realização deste trabalho. Sorte a minha ter orientadores tão competentes, humanos e amigos.

Aqueles que foram essenciais na coleta e processamento dos dados e tornaram meus dias em Viçosa mais leves e agradáveis Flávia, Pagotinho, Juliana, Felipe, Adalgisa, Junin, Iná, Rodrigo, Ingrid, obrigada pela parceria, amizade e agradável convívio. Meu imenso agradecimento a dona Teresinha e ao senhor Jesus que me forneceram material para preparação dos extratos e foram a inspiração desta pesquisa.

Agradecimento especial ao professor Vicente Wagner Dias Casali, por tamanha bondade e capacidade em transmitir uma paz que tranquiliza em todos os momentos: um verdadeiro protetor. A professora Irene Maria Cardoso que é uma verdadeira fonte de inspiração, principalmente quando falamos em AGROECOLOGIA. Que foi essencial no encaminhamento do projeto, e que esteve sempre disposta a contribuir.

A Universidade Federal de Viçosa, a Pós-Graduação em Agroecologia, ao coordenador do programa professor Ricardo e a todos os professores. A secretária/amiga Rô, que sempre esteve disposta a ajudar nas dúvidas e problemas. Parabéns por ser este exemplo de mãe e profissional. Aos colegas do grupo GPMIP da UFV Campus Rio Paranaíba. Ao Departamento de Entomologia, em especial ao professor Raul por disponibilizar o seu laboratório para a realização dos experimentos.

Aos brilhantes e competentes funcionários do apiário da UFV, Iris, Ferreira, Cabrito, aos Toninhos e em especial ao Lulu, que tem o dom de conhecer as abelhas e transmitir seus ensinamentos, um verdadeiro mestre. Sem a sabedoria e auxílio de todos vocês, este trabalho não seria possível.

Agradeço aos membros da banca Maria Elisa, Vicente Casali, Flávia e Maria Augusta por aceitarem o convite e por toda contribuição para este trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço por fim, a todos os agricultores agroecológicos, aos amigos Agroecólogos e aos apaixonados pela Agroecologia. Obrigada por serem agentes transformadores da mudança que nosso mundo precisa. Um salve a Agroecologia!

A todos vocês o meu mais sincero muito obrigada!

BIOGRAFIA

RENATA CUNHA PEREIRA, filha de Lauro Pereira e Maria Helena da Cunha Pereira, nasceu no dia 07 de novembro de 1991, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Em 2010 iniciou o curso de Bacharelado em Agroecologia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba. Em março de 2014, ingressou no mestrado em Agroecologia pela Universidade Federal de Viçosa, sob a orientação do Professor Flávio Lemes Fernandes, cuja dissertação é aqui apresentada.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	2
MATERIAL E MÉTODOS.....	3
Plantas, solventes e insetos.....	3
Bioensaios	4
Bioensaio de Contato.....	5
Bioensaio de Ingestão.....	6
Análises dos dados	7
RESULTADOS.....	7
Sobrevivência	7
Bioensaio de contato.....	7
Bioensaio de ingestão	9
Consumo de alimento	11
Voo	13
Respiração	13
DISCUSSÃO.....	13
REFERÊNCIAS	16

RESUMO

PEREIRA, Renata Cunha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2016.
Seletividade de extratos botânicos às abelhas *Partamona helleri* e *Apis mellifera*.
Orientador: Flávio Lemes Fernandes. Coorientadora: Maria Augusta Lima Siqueira.

Abelhas africanizadas e silvestres são potencialmente suscetíveis a inseticidas sintéticos, mas podem não ser a inseticidas botânicos. O objetivo do trabalho foi avaliar a seletividade dos extratos de *Nicotiana tabacum* L. (folha e rolo), *Anadenanthera columbrina* Vell. e *Agave americana* L., às abelhas *Apis mellifera* e *Partamona helleri*. Avaliou-se ainda o consumo de dieta, a taxa respiratória e o voo das abelhas como parâmetros subletais. Para tanto, realizou-se bioensaios de mortalidade com abelhas adultas mediante exposição por contato e ingestão, utilizando o inseticida imidaclopride como controle positivo. As abelhas sobreviventes foram submetidas aos testes de respiração e voo. A tolerância das abelhas aos extratos variou entre *A. mellifera* e *P. helleri*, de acordo com o tipo de extrato utilizado e em resposta ao tipo de exposição. Após contato, *A. mellifera* apresentou maior suscetibilidade aos extratos de *N. tabacum* (rolo) e *A. americana*. Nos bioensaios de ingestão, o extrato de *A. americana* reduziu a sobrevivência de *P. helleri* e *A. mellifera*. Já a ingestão de *A. colubrina* reduziu a sobrevivência de *A. mellifera*. Apesar de ter ocorrido toxicidade de alguns extratos às abelhas, a sobrevivência foi sempre maior em relação aos resultados obtidos com o imidaclopride, que foi letal para 100 % das abelhas. No consumo da dieta foram observadas diferenças entre os tratamentos, mas que não é observada quando comparados os tratamentos com seus respectivos controles. Foi observado que após o jejum, *A. mellifera* ingeriu pouco alimento contaminado independentemente do tratamento, e quando oferecido alimento livre dos extratos, consumiu maior quantidade do alimento. Ao contrário, *P. helleri* ingeriu maior quantidade de alimento contaminado e reduziu o consumo de alimento puro ao longo do tempo (exceto *N. tabacum* rolo). Ainda que tenham consumido maior quantidade de alimento contaminado, *P. helleri* foi mais tolerante aos extratos (exceto as análises de ingestão de *A. americana*). Tanto nos bioensaios por contato quanto por ingestão, não foram detectados efeitos negativos no voo e na taxa de respiração das abelhas sobreviventes. Concluímos então, que a suscetibilidade aos extratos é variável entre espécies de abelhas, entre compostos e de acordo com o tipo de exposição. De forma geral os extratos se apresentam seletivos as abelhas, e mesmo os extratos mais tóxicos foram mais seletivos do que o imidaclopride.

Assim, caso sejam efetivos contra insetos-alvo, os extratos de *N. tabacum* (folha e rolo), *A. columbrina* e *A. americana* podem ser utilizados como alternativa aos compostos sintéticos de forma a contribuir para a preservação de abelhas melíferas e, principalmente, de abelhas sem ferrão.

Palavras chave: Agroecologia, Polinizadores nativos, Respiração, Voo.

ABSTRACT

PEREIRA, Renata Cunha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2016.
Selectivity of botanical extracts to bees *Partamona helleri* and *Apis mellifera*.
Adviser: Flávio Lemes Fernandes. Co-adviser: Maria Augusta Lima Siqueira.

Africanized and wild bees are potentially susceptible to synthetic insecticides, but may not be the botanical insecticides. The objective was to evaluate the selectivity on bees of botanical extracts of *Nicotiana tabacum* L. (leaf and roll), *Anadenanthera columbrina* Vell. and *Agave americana* L., to bees *Apis mellifera* and *Partamona helleri*. It was also evaluated the dietary consumption, respiration rate and bee flight as sublethal parameters. Therefore, mortality bioassays of adult bees were done by means of contact exposure and ingestion, using the pesticide imidacloprid as a positive control. The surviving bees were submitted to respiration rate and flight tests. *Apis mellifera* reduced the probability of survival after contact with the extracts of *N. tabacum* (roll) and *A. americana*. In the ingestion bioassays, the extract of *A. americana* reduced the survival of *P. helleri* and *A. mellifera*, and *A. colubrina* reduced the survival of *A. mellifera*. The imidacloprid was lethal to 100 % of the bees. In dietary consumption, differences were detected among treatments, but that was not observed when comparing the treatments with their respective controls. It was observed that after fasting, *A. mellifera* ingested some contaminated food regardless of treatment, and when offered free food extracts, it consumed greater amount of food. On the contrary, *P. helleri* ingested greater amount of contaminated food and reduced the consumption of pure food. Although they have consumed larger amounts of contaminated food, in general *P. helleri* was more tolerant to the extracts. In both bioassays by contact and by ingestion negative effects were not detected for the flight and respiration rate of the surviving bees. It was conclude that extracts susceptibility varies among species of bees between compounds and in accordance with the type of exposure. The extracts were selective to bees in general, and even more toxic extracts were more selective than imidacloprid. So if they were effective against target insects, the evaluated extracts can be used as an alternative to synthetic compounds to contribute to the preservation of honey bees of stingless bees.

Dissertação apresentada de acordo com as normas da revista Environmental
Entomology

Seletividade de extratos botânicos às abelhas *Partamona helleri* e *Apis mellifera*

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 90 % das espécies de plantas que apresentam flores e 75 % dos cultivos agrícolas no mundo necessitam da polinização, sendo as abelhas consideradas os polinizadores mais importantes (Brosi & Briggs, 2013; Gianinni et al., 2015). Avalia-se em 153 bilhões de euros o serviço de polinização, o que corresponde a 9,5 % do valor da produção agrícola mundial destinada a alimentação humana (Gallai et al., 2009).

Enquanto os polinizadores, em especial as abelhas, favorecem os cultivos agrícolas (Gianinni et al., 2015), outros insetos são considerados pragas, pois prejudicam os cultivos e aumentam os custos de produção (Gontijo et al., 2013; Gontijo et al., 2015). Sistemas convencionais de produção utilizam pesticidas sintéticos como o principal método de controle destes insetos (Gontijo et al., 2013), apesar dos elevados riscos de contaminação humana, ambiental (Epstein, 2014) e intoxicação de organismos não alvo (Sanchez-Bayo & Goka, 2014). As abelhas estão entre os organismos não alvos que podem ser prejudicadas pela exposição aos pesticidas, e a sua associação com o declínio dos polinizadores tem sido discutida em todo o mundo (Feltham et al., 2014; Johnson, 2015).

Em áreas de produção orgânicas e agroecológicas, onde não é permitida a utilização dos pesticidas, o uso de extratos botânicos tem sido uma opção para o manejo de insetos praga (Isman, 2006; Pereira, 2014). Piretro, rotenona, nim e óleos essenciais são os principais compostos de origem vegetal utilizados no controle de insetos. Ryania, nicotina e sabadilla também são utilizadas, porém com uso limitado. Há ainda, em diversas regiões e países, extratos preparados à base das mais diversas plantas, que são utilizados de acordo com preparações caseiras (Barbosa et al., 2015a), denominados caldas ou extratos botânicos.

Agricultores agroecológicos estão utilizando extratos botânicos de *Nicotiana tabacum* L., *Anadenanthera columbrina* Vell. e *Agave americana* L. com resultados satisfatórios no controle de insetos praga em hortaliças (Pereira, 2014). Porém, pouco se sabe sobre a toxicidade e efeitos subletais destes compostos sobre os organismos não alvos (ex. abelhas) (Tomé et al., 2014; Barbosa et al., 2015b; Tomé et al., 2015). Pois o fato de serem extratos botânicos, não os isentam de apresentar riscos aos organismos benéficos (Gontijo et al., 2015; Tomé et al., 2015).

Uma maneira de reduzir os riscos aos organismos benéficos é realizando avaliações adequadas dos extratos botânicos, a fim de identificar compostos que apresentem

seletividade as abelhas. E dois são os tipos de seletividade: a seletividade ecológica e a seletividade fisiológica. Seletividade ecológica consiste na utilização de técnicas de aplicação de compostos pesticidas a fim de minimizar o contato entre o produto utilizado e o inseto não alvo. Já a seletividade fisiológica busca identificar compostos que sejam mais tóxicos aos insetos praga, do que aos insetos benéficos (Pedigo, 1988). Neste trabalho, o termo seletividade será abordado referindo-se à seletividade fisiológica.

Assim, objetivou-se avaliar a seletividade dos extratos botânicos com formulações caseiras de *N. tabacum* L., *A. columbrina* Vell e *A. americana* L., às abelhas da família Apidae *Apis mellifera* (Apinini) e *Partamona helleri* (Meliponini). Estas abelhas foram selecionadas para o estudo uma vez que abelhas melíferas e abelhas sem ferrão constituem os principais polinizadores no Brasil (Gianinni et al., 2015). Verificou-se ainda o consumo de dieta, a taxa respiratória e o voo como parâmetros subletais às abelhas.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas, solventes e insetos

Os produtos a base de fumo (folha e rolo) (*N. tabacum* L.), angico vermelho (*A. columbrina* Vell) e piteira (*A. americana* L.) foram selecionadas por serem usados por produtores agroecológicos. Os extratos são utilizados no controle de pulgão (*Metopolophium dirhodum*), cochonilha (*Dactylopius coccus*), lagartas e besouros na produção de hortaliças, como *Lactuca sativa* L. (alface), *Cichorium intybus* L. (almeirão), *Brassica oleracea* L. (couve), *Allium fistulosum* L. (cebolinha), *Eruca sativa* Mill. (rúcula), *Rumex acetosa* L. (azedinha), dentre outras (Pereira, 2014). As folhas de fumo, a piteira e o angico foram coletados em uma propriedade na região de Viçosa, MG (20°43'58,37"S, 42°49'23,50"), altitude 738 m. Já o fumo de rolo e o imidaclopride (Evidence 700 WG) foram adquiridos no comércio na cidade de Viçosa, MG.

Os solventes utilizados no preparo dos extratos foram água com álcool etílico (96° GL) para os extratos de fumo (rolo e folha) e apenas água para os extratos de piteira e angico. O preparo dos extratos seguiu os procedimentos de acordo com a metodologia descrita por Pereira (2014).

O fumo de rolo foi cortado em partículas de 10 cm e acondicionado 100 g em frasco de vidro (1 L) e adicionados 250 mL de álcool e 250 mL de água. Após 10 dias foi filtrado em algodão e diluído na concentração de 33,33 mL L⁻¹ (v/v). O mesmo procedimento foi realizado no preparo do extrato à base das folhas do fumo. A casca do angico vermelho foi coletada retirando pedaços retangulares com auxílio de facão em uma árvore já adulta e 250 g destas foram inseridas em uma garrafa plástica contendo 250 mL de água. Após 30 dias o extrato foi filtrado em algodão e diluído em água na concentração de 10 mL L⁻¹ (v/v). As folhas da piteira foram cortadas com um facão, os espinhos retirados e as folhas fatiadas com uma faca. Em liquidificador foram adicionados 100 g das folhas e 0,1 L de água e processado por três minutos. Para retirar os fragmentos maiores, o extrato foi filtrado em peneira e posteriormente em algodão. O extrato da piteira foi diluído na concentração de 3000 mL L⁻¹ (v/v) (Pereira, 2014). A quantidade utilizada do imidaclopride (700 WG) foi calculada com base no volume de pulverização por hectare, na concentração de 3,00 mg de i.a. m⁻² (300 g ha⁻¹), de acordo com as recomendações do Ministério da Agricultura (MAPA, 2014). A diluição foi realizada em água destilada e deionizada para realização dos bioensaios por contato e em solução de sacarose 50 % (xarope de água/açúcar 50 % v/v) para os bioensaios de ingestão (Tomé et al., 2015).

Para montagem dos bioensaios utilizou-se operárias adultas de *A. mellifera* (abelha africanizada) e *P. helleri* (abelha sem ferrão). Essas abelhas foram coletadas no apiário e meliponário da Universidade Federal de Viçosa, 20°45'32,71" S, 42°52'04,10" O e altitude 815 m. Para a coleta de *P. helleri* utilizou-se um frasco Erlenmeyer (1 L), inserindo-se a sua abertura na entrada da colmeia para que as abelhas entrassem no frasco. Logo após, em um quarto escuro, liberou-se as abelhas em gaiolas de organza (0,4 x 0,4 x 0,4 m), com luz branca ao fundo para evitar a fuga e facilitar a transferência das abelhas para os potes plásticos (0,5 L). Por outro lado, *A. mellifera* foram coletadas manualmente das colônias, com auxílio de pinças entomológicas (Papilon, número 13) e transferidas diretamente para os potes de plástico (0,5 L).

Bioensaios

Os bioensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com sete tratamentos e cinco repetições para cada espécie (considera-se cada colônia uma

repetição). Os tratamentos foram: os extratos botânicos (folhas de *A. americana*, casca de *A. columbrina*, *N. tabacum* - folhas e rolo), o inseticida imidaclopride (controle positivo) e as testemunhas (solventes: água e água com álcool). Cada unidade experimental foi composta por 20 abelhas adultas, coletadas na mesma colônia em cada repetição.

Bioensaio de Contato

No bioensaio de exposição por contato utilizou-se potes plásticos de polietileno transparente com volume de 0,5 L, que apresentam resistência a produtos químicos orgânicos sob exposição em curto prazo (Nerin et al, 1996). Esses potes continham furos na tampa para a circulação do ar e uma abertura circular na lateral para posterior adição de um alimentador às abelhas. Em cada pote foram pulverizados 500 µl do respectivo tratamento (lateral e fundo com 395 µl e tampa com 105 µl), utilizando-se um compressor com pressão de 50 PSI (Sagyima Pro, modelo ASW 186), de forma a cobrir toda a área interna do pote. Para as testemunhas os potes foram tratados apenas com o solvente utilizado no processo de obtenção dos extratos botânicos. Posteriormente, deixou-se secar à $25 \pm 3^\circ \text{C}$ por duas horas em ambiente fechado e escuro. Em cada pote, previamente tratado, foram adicionadas 20 abelhas e um alimentador com um furo na extremidade (Eppendorf®), onde foi fornecida alimentação (xarope de água/açúcar 50 % v/v). Após três horas de contato, as abelhas foram transferidas para recipientes não tratados, descartando os potes contaminados. Os potes com as abelhas foram mantidos em estufa B.O.D. ($28 \pm 2^\circ \text{C}$, $65 \pm 5\%$ U.R.). A mortalidade das abelhas foi registrada uma, duas, três, seis, doze e vinte e quatro horas e foram consideradas mortas quando incapazes de se locomover. As abelhas sobreviventes a cada tratamento foram submetidas aos testes de respiração e voo.

A respiração das abelhas foi avaliada em condições de laboratório, utilizado respirômetro do tipo CO₂ Analiser TR 2 (Sable System International, Las Vegas, EUA) (Pimentel et al., 2007). Ao final do bioensaio, uma abelha de cada tratamento, foi transferida para uma câmara respirométrica de vidro, com capacidade volumétrica de 0,25 L. Estas câmaras são conectadas a um sistema completamente fechado, com um leitor infravermelho, no qual circula ar livre de CO₂ para dentro da câmara durante dois minutos, a uma taxa de fluxo de 6000 mL min^{-1} . O aparelho faz a mensuração durante

um período de três horas da quantidade de CO₂ (µmL/CO₂/h/abelha) (Tomé et al. 2014). Realizou-se cinco repetições.

Para avaliar o voo após 24 horas de exposição aos extratos, todas as abelhas sobreviventes foram liberadas na base de uma torre de madeira de 1,05 m de altura, formada por três gaiolas de madeira empilhadas (0,35 × 0,35 × 0,35 m cada). As gaiolas eram envoltas com tela de organza, com seu interior aberto para permitir o livre voo das abelhas. O teste de voo foi realizado em sala escura, com apenas uma luminária de luz fluorescente, suspensa a 0,05 m da parte superior da torre. O tempo gasto de voo da base até chegarem à luz era contabilizado em cronômetro, sendo esperado até 1'30" (um minuto e trinta segundos). Após esse tempo, as abelhas que permaneciam na base da torre eram consideradas incapazes voar (Tomé et al., 2015).

Bioensaio de Ingestão

Vinte abelhas foram adicionadas a potes plásticos de polietileno transparente com volume de 0,5 L, contendo furos na tampa para a circulação do ar e uma abertura na lateral para adição do alimentador (Tomé et al., 2015). As abelhas permaneceram em jejum por uma hora e meia e após este período foi adicionado em cada pote, um alimentador com o alimento previamente contaminado com os tratamentos. Os alimentadores foram pesados em balança analítica (Shimadzu:AUW220D:0,01mg) antes e após o experimento, para verificar a quantidade de alimento ingerido pelas abelhas. Os alimentos fornecidos foram os extratos diluídos, na mesma concentração dos bioensaios por contato, porém a diluição foi realizada em solução de sacarose (xarope de água/açúcar 50 % v/v). Para a testemunha água foi utilizado apenas o xarope de água/açúcar 50 % (v/v) e para testemunha água com álcool foi utilizado 48,26 % de água, 1,74 % de álcool e 50 % açúcar (v/v/v). Após três horas, o alimento contaminado foi substituído pelo alimento puro (xarope de água/açúcar 50 % v/v). Os potes contendo as abelhas, foram mantidos em estufa B.O.D. (28 ± 2 °C, 65 ± 5 % U.R.). A mortalidade foi avaliada após uma, duas, três, seis, doze e vinte e quatro horas, sendo consideradas mortas às abelhas que permaneciam imóveis. As abelhas que sobreviveram foram submetidas aos testes de voo de respiração (conforme descrito para o bioensaio por contato).

Análises dos dados

Os dados de sobrevivência dos bioensaios por contato e ingestão foram submetidos a análises de sobrevivência usando os estimadores de Kaplan-Meier (SigmaPlot 12.0). As abelhas ainda vivas no final dos bioensaios (24 horas) foram tratadas como dados censurados, pois não se conhece o tempo exato de sobrevivência destas abelhas. A semelhança global entre as curvas de sobrevivência foi testada pelo teste de Log-Rank χ^2 e as comparações pareadas entre as curvas foram testadas usando o método de Holm-Sidak (Tomé et al., 2015). Os dados do consumo da dieta no ensaio de ingestão foram submetidos à análise de variância de medida repetida para testar o efeito do consumo da dieta em relação ao tempo, e eventuais diferenças nos intervalos de tempo foram testadas pelo teste F (PROC ANOVA; SAS Institute 2008). Os dados do tempo de voo foram submetidos à análise de variância e os da respiração utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Zar, 1999).

RESULTADOS

Sobrevivência

Bioensaio de contato

Curvas de sobrevivência obtidas pelos estimadores Kaplan-Meier mostraram diferenças significativamente entre os tratamentos para *P. helleri* (Log-rank test: $\chi^2 = 767,97$, g.l. = 6, $P < 0,001$) e *A. mellifera* (Log-rank test: $\chi^2 = 728,69$, g.l. = 6, $P < 0,001$) (Fig. 1). Os extratos de *N. tabacum* (folha) e *A. colubrina* não alteraram a sobrevivência das duas espécies de abelhas se comparados aos seus controles água com álcool e água respectivamente. Já o extrato de *N. tabacum* (rolo) diminuiu a sobrevivência das duas espécies de abelhas avaliadas (Fig. 1). O contato com o extrato de *A. americana* reduziu significativamente a probabilidade de sobrevivência de *A. mellifera* (Fig. 1c), mas não alterou a sobrevivência de *P. helleri* (Fig. 1 a). Notamos com estes resultados um efeito negativo do solvente álcool, utilizado no preparo dos extratos de *N. tabacum* (folha e rolo), na sobrevivência das abelhas. Observamos ainda que as abelhas *A. mellifera* apresentaram uma menor probabilidade de sobrevivência em todos os tratamentos, quando comparadas à probabilidade de sobrevivência de *P. helleri*

(Fig. 1a, c). Já o contato com imidaclopride causou mortalidade de 100 % das abelhas de ambas as espécies após 20 minutos de exposição (Fig. 1a, c).

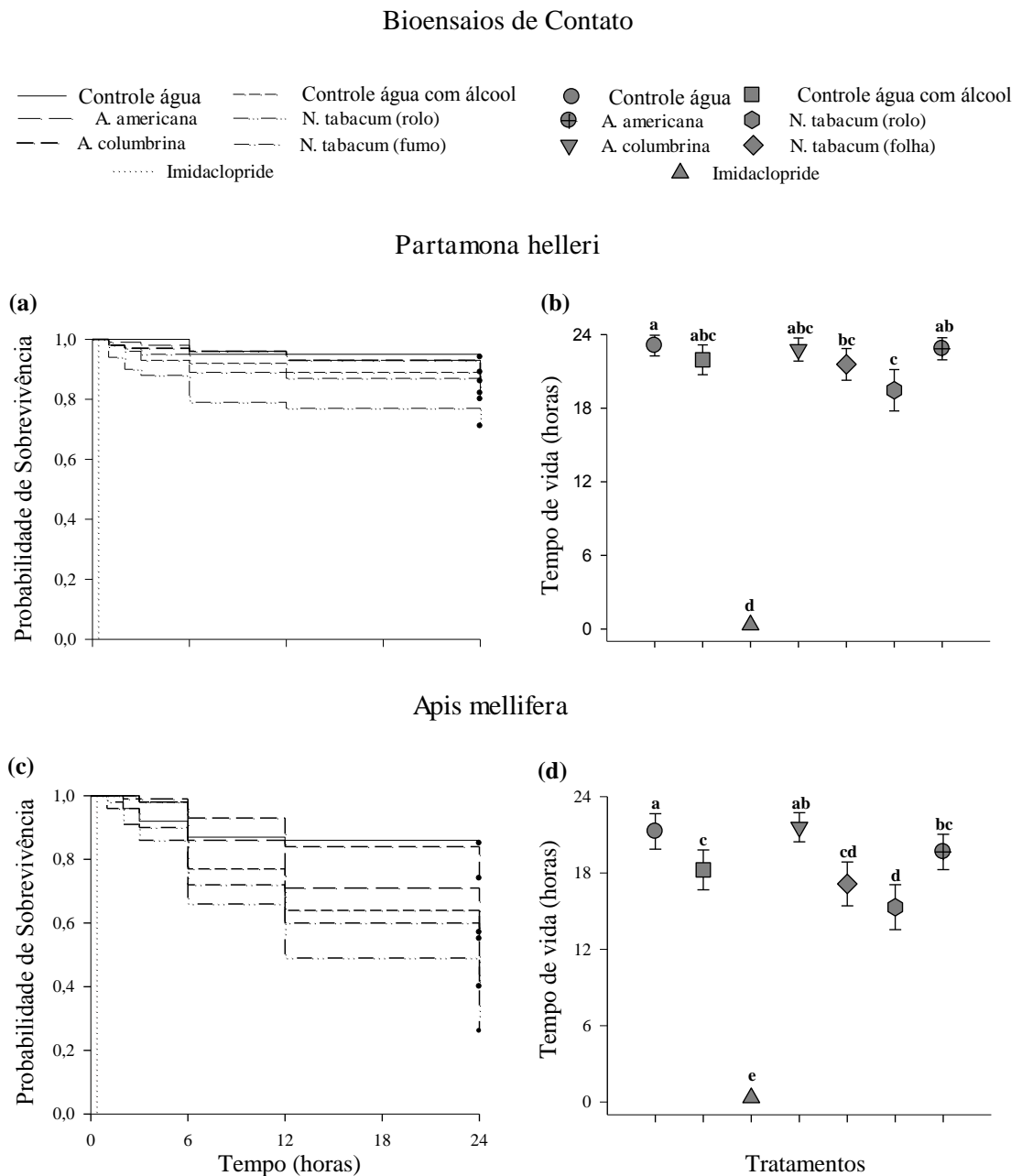
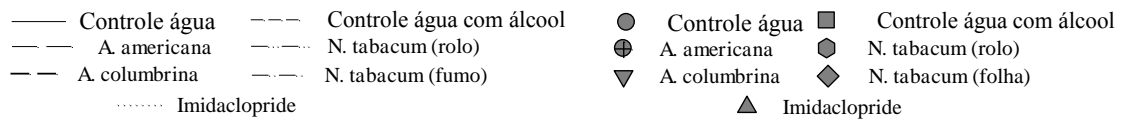


Fig. 1 Curvas de sobrevivência de *Partamona helleri* (a) e *Apis mellifera* (c) expostas por contato aos extratos botânicos. As curvas foram geradas por estimadores de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank ($P < 0,05$). Os diagramas de caixa representam o tempo médio (horas de vida) e intervalo de confiança da sobrevivência das abelhas *P. helleri* (b) e *A. mellifera* (d). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos com base no teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$).

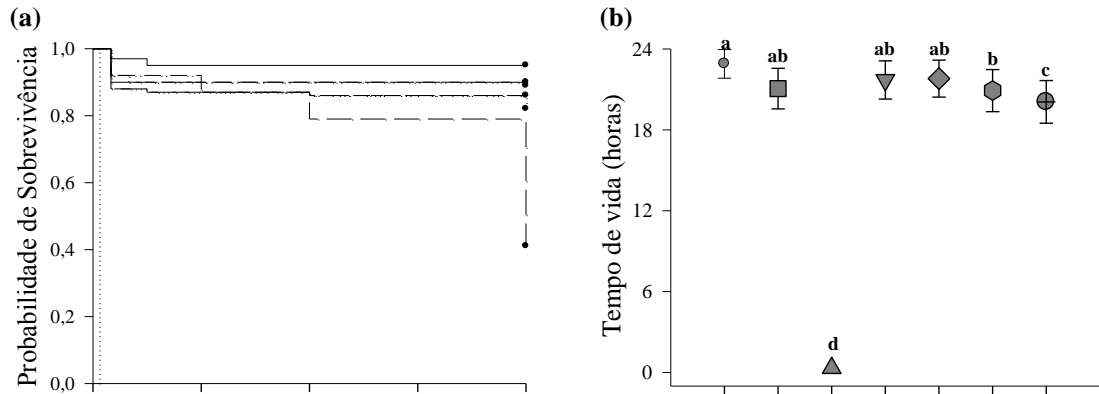
Bioensaio de ingestão

As curvas de sobrevivência obtidas pelos estimadores Kaplan-Meier indicam que a ingestão dos extratos alterou a sobrevivência das abelhas *P. helleri* (Log-rank test: $\chi^2 = 619,49$, g.l. = 6, $P < 0,001$) e *A. mellifera* (Log-rank test: $\chi^2 = 768,96$, g.l. = 6, $P < 0,001$) (Fig. 2). A sobrevivência das duas espécies de abelhas foi afetada pelo extrato de *A. americana*. Já o extrato de *A. colubrina* afetou a sobrevivência apenas de *A. mellifera* (Fig. 2c). Assim, conforme observado para os ensaios de contato, o álcool também apresentou efeitos negativos na sobrevivência das abelhas. Com exceção do extrato de *A. americana*, as abelhas *A. mellifera* apresentaram uma menor probabilidade de sobrevivência, quando comparadas à probabilidade de sobrevivência de *P. helleri* (Fig. 2a, c). A ingestão de imidaclopride matou 100 % de *P. helleri* e de *A. mellifera* após 20 minutos de exposição (Fig. 2a, c). Assim, não foram realizados os testes de voo e respiração com as abelhas deste tratamento.

Bioensaios de Ingestão



Partamona helleri



Apis mellifera

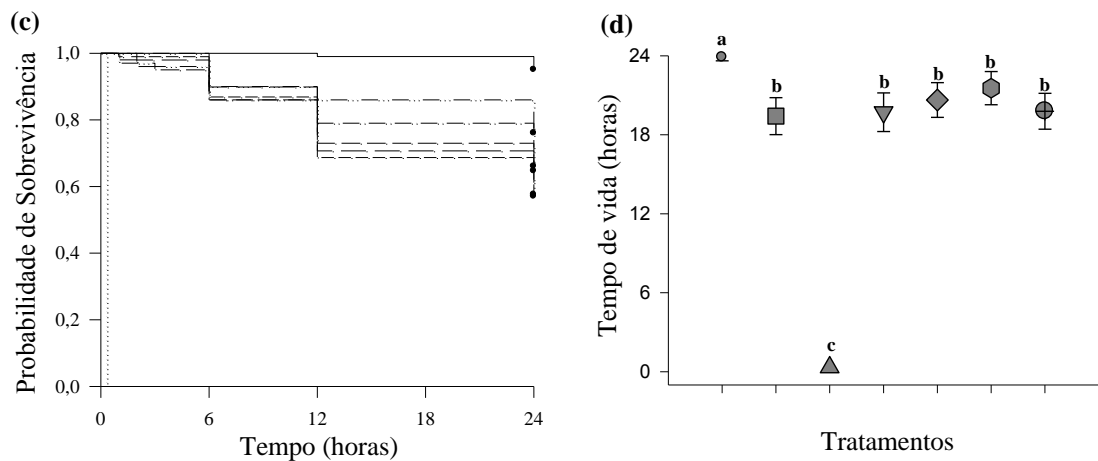


Fig. 2 Curvas de sobrevivência de *Partamona helleri* (a) e *Apis mellifera* (c) expostas por ingestão aos extratos botânicos. As curvas foram geradas por estimadores de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank ($P < 0,05$). Os diagramas de caixa representam o tempo médio (horas de vida) e intervalo de confiança da sobrevivência das abelhas *P. helleri* (b) e *A. mellifera* (d). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos com base no teste de Holm-Sidak ($P < 0,05$).

Consumo de alimento

O tipo de extrato testado alterou a massa de alimento ingerido por *A. mellifera* ($F_{5, 24} = 4,00$, $P < 0,001$). Nessa espécie, o consumo de alimento também modificou ao longo do tempo (Wilk`s Lambda = 0,03, $F_{1, 24} = 732,90$, $P < 0,001$). Entretanto, não houve interação entre o tempo e o tipo de tratamento sobre a alimentação de *A. mellifera* (Wilk`s Lambda = 0,76, $F_{5, 24} = 1,48$, $P = 0,234$) (Fig. 3a). Já para as abelhas *P. helleri* o tipo de extrato alterou a massa de alimento ingerida ($F_{5, 24} = 5,33$, $P = 0,002$). Ao longo do tempo *P. helleri* também modificou o consumo de alimento (Wilk`s Lambda = 0,51, $F_{1, 24} = 23,47$, $P < 0,001$). E houve ainda interação entre o tempo e o tipo de tratamento (Wilk`s Lambda = 0,63, $F_{5, 24} = 2,77$, $P = 0,041$) (Fig. 3b). Embora observada diferença entre os tratamentos, não observamos diferenças entre os tratamentos e os seus respectivos controles (*N. tabacum* folha e rolo com o controle água com álcool e *A. americana* e *A. colubrina* com o controle água).

No consumo de alimento puro, oferecido após as três horas de exposição oral aos extratos, não se observa diferenças em relação aos tratamentos. O que se observa é um comportamento inverso entre as abelhas *P. helleri* e *A. mellifera*. As abelhas *P. helleri* consomem mais o alimento contaminado com os extratos ao alimento puro (solução de sacarose livre dos tratamentos), exceto no tratamento fumo de *N. tabacum* rolo. Já *A. mellifera* consome pouco do alimento contaminado, e aumenta o consumo quando oferecido o alimento puro (Fig. 3).

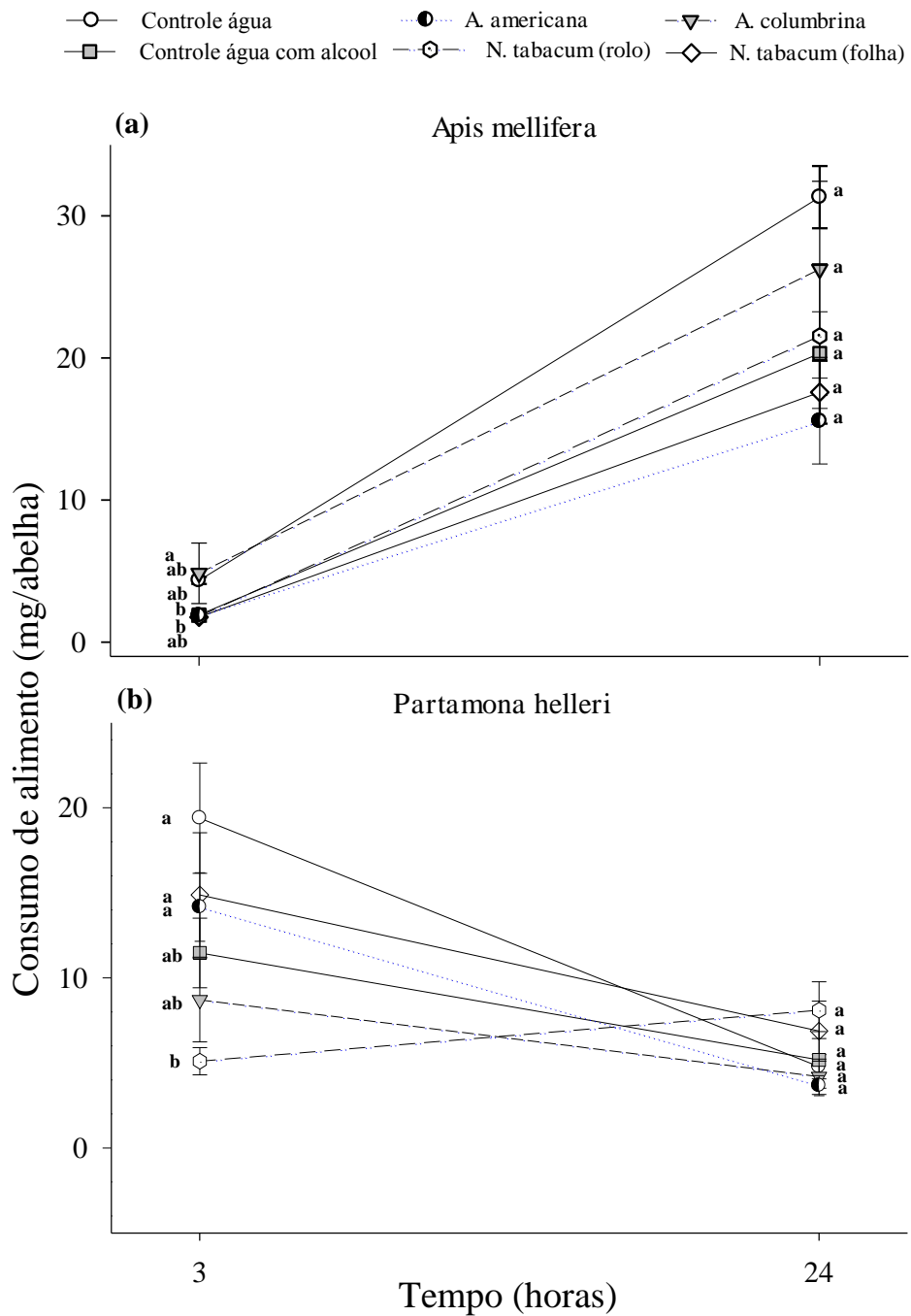


Fig. 3 Massa de alimento consumido por *A. mellifera* e *P. helleri* no ensaio de ingestão. Nas três primeiras horas o gráfico mostra o consumo do alimento contaminado com os extratos e depois o consumo do alimento contendo solução de sacarose livre dos tratamentos. Os símbolos representam a média e o erro padrão. As letras diferentes, no mesmo tempo (hora), indicam diferença significativa entre os tratamentos com base no teste de Tukey ($P < 0,05$).

Voo

O contato das abelhas com os tratamentos, ao final de 24 horas, não afetou o voo de *P. helleri* ($F_{5,24} = 1,69$, $P = 0,174$) e *A. mellifera* ($F_{5, 24} = 2,27$, $P = 0,079$). Comportamento semelhante foi observado para os bioensaios de ingestão, onde os tratamentos também não afetaram o voo das abelhas *P. helleri* ($F_{5, 24} = 2,25$; $P = 0,081$) e *A. mellifera* ($F_{5, 24} = 0,70$; $P > 0,05$).

Respiração

O contato com os tratamentos não alterou a taxa de respiração das abelhas não diferiu entre os tratamentos (*P. helleri*: $\chi^2 = 4,82$; g.l. = 5; $P = 0,438$; *A. mellifera*: $\chi^2 = 1,08$; g.l. = 5; $P = 0,956$). A média \pm erro padrão da taxa de respiração para *P. helleri* foi $43,85 \pm 5,70 \mu\text{L}/\text{CO}_2 / \text{h} / \text{abelha}$ e para *A. mellifera* foi de $116,80 \pm 15,77 \mu\text{L}/\text{CO}_2 / \text{h} / \text{abelha}$.

A taxa respiratória das abelhas também não foi modificada após a ingestão dos diferentes tratamentos (*P. helleri*: $\chi^2 = 9,48$, g.l. = 6, $P = 0,091$; *A. mellifera*: $\chi^2 = 4,42$, g.l. = 6, $P = 0,491$). A média \pm erro padrão da taxa de respiração de *P. helleri* $62,89 \pm 13,73 \mu\text{L}/\text{CO}_2 / \text{h} / \text{abelha}$ e de *A. mellifera* foi $105,76 \pm 19,43 \mu\text{L}/\text{CO}_2 / \text{h} / \text{abelha}$.

DISCUSSÃO

A suscetibilidade das abelhas aos extratos variou entre *A. mellifera* e *P. helleri*, de acordo com o tipo de extrato utilizado nos bioensaios e em resposta ao tipo de exposição. Após exposição por contato, *A. mellifera* apresentou maior suscetibilidade aos extratos de *N. tabacum* (rolo) e *A. americana* (Fig. 1c). Já a ingestão de *A. americana* reduziu significativamente a sobrevivência de *P. helleri* e *A. mellifera* e *A. colubrina* reduziu a sobrevivência de *A. mellifera* (Fig. 2a, c). De forma geral, os extratos foram mais seletivos a *P. helleri*. Logo após o jejum, *A. mellifera* ingeriu pouco alimento contaminado independentemente do tratamento, mas quando oferecido alimento livre dos extratos, *A. mellifera* consumiu maior quantidade do alimento (Fig 3a). Já *P. helleri*, logo após jejum, ingeriu grande quantidade de alimento e reduziu o consumo de alimento puro ao longo do tempo (exceto *N. tabacum* rolo) (Fig 3b). Apesar

de ter ocorrido toxicidade de alguns extratos às abelhas, a sobrevivência foi sempre maior em relação aos resultados obtidos com o controle positivo. O imidaclopride causou mortalidade de 100 % de ambas às espécies de abelhas, no máximo 20 minutos após exposição por contato ou ingestão. As abelhas sobreviventes aos tratamentos não apresentaram alterações na taxa de respiração e voo.

Abelhas apresentam preferência por néctar contaminado com imidaclopride (Kessler et al., 2015), o que traz uma preocupação, pois a elevada toxicidade deste pesticida para as abelhas já é bem comprovada (Goulson, 2013; Johnson, 2015). Esta alta toxicidade se explica pela presença do grupo funcional nitro que confere a este pesticida grande afinidade ao receptor nicotínico de acetilcolina (Tomizawa & Casida, 2003). Os neonicotinoides são sistêmicos (Blacquièrre et al., 2012), podendo ser translocados até o grão de pólen e néctar (Goulson, 2013). Portanto, podem ser transportados até as colônias, podendo causar intoxicação por ingestão (Mullin, 2010) e/ou contato (Fairbrother et al., 2014). Dessa forma, os neonicotinoides podem extinguir a colônia, sendo apontados como uma das causas para a Desordem no Colapso de Colônias (CCD - Colony Collapse Disorder) (Blacquièrre et al., 2012; Goulson, 2013).

Esperava-se então, que extratos de *N. tabacum* não fossem seletivos às abelhas, já que nicotina e neonicotinoide têm mecanismos de ação semelhantes em insetos (Rand et al., 2015). De fato, para abelhas melíferas no bioensaio de contato, essa seletividade não foi observada (mortalidade > 60 %). Já para *P. helleri* os extratos de *N. tabacum* (folha e rolo) se apresentaram seletivos tanto nos bioensaios por contato quanto por ingestão (mortalidade < 30 %). Embora a décadas relata-se que abelhas de maior volume corporal apresente maior tolerância aos pesticidas, seja na exposição por contato ou ingestão (Johansen et al., 1983) e alguns autores relataram que abelhas sem ferrão (*Meliponini*) são mais sensíveis aos pesticidas (Tomé et al., 2012; Del Sarto et al., 2014), os resultados mostraram que *P. helleri* foi mais tolerante aos extratos que *A. mellifera*. A menor suscetibilidade de *P. helleri* aos extratos pode estar relacionada a diversos aspectos além da espécie e tamanho corporal, tais como, diferenças genéticas, ciclo de vida, alimentação, comportamento de forrageamento e tipo de exposição (Arena & Sgolastra, 2014; Johnson, 2015).

A maior toxicidade do extrato de *A. americana* às abelhas pode-se atribuir à alta concentração deste extrato (3000 mL L⁻¹ v/v). Embora nas condições de laboratório o extrato de *A. americana* ingerido por *P. helleri* e *A. mellifera* e no contato com *A.*

mellifera tenha apresentado baixa seletividade, nas condições de campo a seletividade pode ser maior. Isto porque os extratos botânicos são de rápida degradação comparada aos pesticidas sintéticos formulados (Fantke et al., 2014; Tomé et al., 2015).

O consumo diferenciado de alimento entre as espécies pode ser devido ao comportamento natural de alimentação, visto que não houve diferenças entre as testemunhas e os tratamentos. Abelhas melíferas forrageiras são capazes de perceber que correm risco de passar fome, assim, elas carregam uma maior quantidade de alimento quando deixam o ninho para forragear (Tan et al., 2015). Possivelmente esta estratégia de *A. mellifera* explica um menor consumo do alimento contaminado após o jejum e, quando oferecido alimento livre dos extratos, elas aumentam o consumo para compensar a baixa ingestão após a inanição.

O voo e a respiração das abelhas *A. mellifera* e *P. helleri* não foi afetado pelos extratos em ambos os bioensaios (contato e ingestão). Tal resultado, possivelmente está relacionado a não atuação dos extratos na musculatura, ou mesmo no sistema nervoso das abelhas (Zafeiridou & Theophilidis, 2006). É fato que se os compostos afetassem o voo das abelhas, poderiam alterar o hábito de forrageamento e a sobrevivência da colônia (Henry et al., 2012; Tomé et al., 2012; Balbuena et al., 2015).

A seletividade de extratos botânicos a organismos não alvo já foi demonstrada (Castillo et al., 2009), mas há controvérsias (Barbosa et al., 2015b; Gontijo et al., 2015; Tomé et al., 2015). Porém, trabalhos que avaliaram a seletividade de extratos botânicos com formulações caseiras a abelhas melíferas e silvestres não foram encontrados. Este é primeiro trabalho a realizar este tipo de avaliação. O que se sabe em relação a tolerância das abelhas as toxinas naturais e sintéticas, é que um dos principais mecanismos utilizados é a resistência metabólica. E que as principais enzimas responsáveis pelo metabolismo ou desintoxicação das toxinas são a carboxilesterases (COEs), glutathione S-transferase (GSTs) e citocromo P450 (Rand et al., 2015). Mas ainda assim, existe a necessidade de novos trabalhos para conhecer os grupos de compostos químicos presentes e os pesos moleculares dos extratos utilizados para melhor esclarecer os mecanismos que conferem a estes extratos botânicos seletividade às abelhas. Os mecanismos que permitem as abelhas tolerar os metabolitos secundários tóxicos permanecem desconhecidos (Rand et al., 2015).

O nosso trabalho, entretanto, demonstrou que a suscetibilidade aos extratos é variável entre espécies de abelhas, entre compostos e de acordo com o tipo de

exposição. E que, mesmo os extratos mais tóxicos foram mais seletivos às abelhas do que o pesticida sintético usado como controle positivo. Isso demonstra que, caso sejam efetivos contra insetos-alvo, esses extratos podem ser utilizados como alternativa aos compostos sintéticos de forma a contribuir para a preservação de abelhas melíferas e sem ferrão.

REFERÊNCIAS

- Arena M. and F. Sgolastra. 2014.** A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*. 23: 324-334.
- Balbuena M. S., L. Tison, M. L. Hahn, U. Greggers, R. Menzel and W. M. Farina. 2015.** Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *J. Exp. Biol.* 218: 2799-805.
- Barbosa W. F., G. Smagghe and R. N. C. Guedes. 2015a.** Pesticides and reduced risk insecticides, native bees and Pantropical stingless bees: Pitfalls and perspectives. *Pest. Manag. Sci.* 71: 1049-1053.
- Barbosa W. F., H. V. V. Tomé, R. C. Bernardes, M. A. P. Lima, G. Smagghe and R. N. C. Guedes. 2015b.** Biopesticide-induced alterations in stingless bee species. *Environ. Toxicol. Chem.* 34: 2149-2158.
- Blacquièrè T., G. Smagghe, C. A. M. Van Gestel and M. Mommaerts. 2012** Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*. 21: 973-992.
- Brosi B. J. and H. M. Briggs (2013)** Single pollinator species losses reduce floral fidelity and plant reproductive function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110: 13044-13048.
- Castillo L., A. Gonzalez-Coloma, A. Gonzalez, M. Diaz, E. Santos, Alonso-Paz, M. J. Bassagoda and C. Rossini. 2009.** Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. *Ind. Crops. Prod.* 29: 235-240.
- Del Sarto M. C., E. E. Oliveira, R. N. C. Guedes and L. A. O. Campos. 2014.** Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*. 45: 626-636.
- Epstein L. 2014.** Fifty years since silent spring. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52: 377-402.
- Fairbrother A., J. Purdy, T. Anderson and R. Fell. 2014.** Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environ. Toxicol. Chem.* 33: 719-731.

- Fantke P., B. W. Gillespie, R. Juraske and O. Joliet. 2014.** Estimating half-lives for pesticide dissipation from plants. *Environ. Sci. Technol.* 48: 8588-8602.
- Feltham H., K. Park and D. Goulson. 2014.** Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology.* 23: 317-323.
- Gallai N., J. M. Salles, J. Settele and B. Vaissiere. 2009.** Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol. Econ.* 68: 810-821.
- Gianinni T. C., S. Boff, G. D. Cordeiro, E. A. Cartolano Jr., A. K. Veiga, V. L. Imperatriz-Fonseca and A. M. Saraiva. 2015.** Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie.* 46: 209-223.
- Gontijo L. M., D. Celestino, O. S. Queiroz, R. N. C. Guedes and M. C. Picanço. 2015.** Impacts of azadirachtin and chlorantraniliprole on the developmental stages of pirate bug predators (Hemiptera: Anthocoridae) of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Fla. Entomol.* 98: 59-64.
- Gontijo P. C., M. C. Picanço, E. J. G. Pereira, J. C. Martins, M. Chediak and R. N. C. Guedes. 2013.** Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta*). *Ann. Appl. Biol.* 162: 50-59.
- Goulson D. 2013.** Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J Applied. Ecology.* 50: 977-987.
- Henry M., M. Béguin, F. Requier, O. Rollin, J. F. Odoux, P. Aupinel, J. Aptel, S. Tchamitchian and A. Decourtye. 2012.** A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science.* 336: 348-350.
- Isman M. B. 2006.** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51: 45-66.
- Johansen C. A., D. F. Mayer, J. D. Eves and C. W. Kious. 1983.** Pesticides and bees. *Environ Entomol*
- Johnson R. M. (2015)** Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.* 60: 415-434.
- Kessler S. C., E. J. Tiedeken, K. L. Simcock, S. Derveau, J. Mitchell, S. Softley, J. C. Stout and G. A. Wright. 2015.** Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature.* 000: 1-14.
- (MAPA) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015.** Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS – Agrofit, Brasília, DF. (<http://>

extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) (acesso em 27 de Outubro de 2014).

- Mullin C. A., M. Frazier, J. L. Frazier, S. Ashcraft, R. Simonds, D. VanEngelsdorp and J. S. Pettis. 2010.** High levels of miticides and agrochemicals in north American apiaries: implications for honey bee health. *Plos One*. 5: e9754.
- Nerin C., A. R. Tornés, C. Domeño and J. Cacho. 1996.** Absorption of pesticides on plastic films used as agricultural soil covers. *J. Agric. Food. Chem.* 44: 4009-4014.
- Pedigo L. P. 1988.** Entomology and pest management. New York: Macmillan, 646 p.
- Pereira A. J. 2014.** Diálogos de saberes no cultivo de hortas agroecológicas. Dissertação, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- Pimentel M. A. G., L. R. A. Faroni, M. R. Tótola and R. N. C. Guedes. 2007.** Phosphine resistente, respiration rate and fitness consequences in stored-product insects. *Pest. Manag. Sci.* 63: 876-881.
- Rand E. E. du, S. Smit, M. Beukes, Z. Apostolides, C. W. W. Pirk and S. W. Nicolson. 2015.** Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci. Rep.* 5: 1-11.
- Sanchez-Bayo F. and K. Goka. 2014.** Pesticide residues and bees-a risk assessment. *Plos One* 9e94482
- SAS Institute. 2008.** SAS/STAT user's guide. SAS Institute, Cary, NC.
- Tomé H. V. V., W. F. Barbosa, G. F. Martins and R. N. C. Guedes. 2014.** Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere.* 124: 103-109.
- Tomé H. V. V., W. V. Barbosa, A. S. Corrêa, L. M. Gontijo, G. F. Martins and R. N. C. Guedes. 2015.** Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Ann. Appl. Biol.* 167: 186-196.
- Tomé H. V. V., G. F. Martins, M. A. P. Lima, L. A. O. Campos and R. N. C. Guedes. 2012.** Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Plos One.* 7: e38406.
- Tomizawa M. and J. E. Casida. 2003.** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of Insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 339-364.

- Tan K., T. Latty, S. Dong, L. Xiwen, C. Wang and B. P. Oldroyd. 2015.** Individual honey bee (*Apis cerana*) foragers adjust their fuel load to match variability in forage reward. *Sci. Rep.* 5: 1-7.
- Zafeiridou G. and G. Theophilidis. 2006.** A simple method for monitoring the respiratory rhythm in intact insects and assessing the neurotoxicity of insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 86: 211-217.
- Zar J. H. 1999.** Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.