

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

FERNANDA GOMES DE CARVALHO

**TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA FIPRONIL PARA *APIS MELLIFERA* AFRICANIZADA
E *SCAPTOTRIGONA BIPUNCTATA***

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA
BIODIVERSIDADE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA FIPRONIL PARA *APIS MELLIFERA*
AFRICANIZADA E *SCAPTOTRIGONA BIPUNCTATA***

Autora: Fernanda Gomes de Carvalho

Orientadora: Dra. Betina Blochtein

Porto Alegre

2021

FERNANDA GOMES DE CARVALHO

**TOXICIDADE AGUDA DO INSETICIDA FIPRONIL PARA *APIS MELLIFERA*
AFRICANIZADA E *SCAPTOTRIGONA BIPUNCTATA***

Dissertação apresentada como requisito para
a obtenção do grau de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução
da Biodiversidade da Escola de Ciências da
Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade
Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Dra. Betina Blochtein

Porto Alegre

2021

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
APRESENTAÇÃO.....	III
MANUSCRITO CIENTÍFICO.....	1
RESUMO.....	3
INTRODUÇÃO.....	3
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
RESULTADOS.....	13
DISCUSSÃO.....	17
AGRADECIMENTOS.....	20
REFERÊNCIAS.....	22

RESUMO

As abelhas constituem importante grupo de polinizadores, necessário para a manutenção da biodiversidade. Suas populações estão em declínio devido a ações antrópicas, dentre as quais o uso de produtos químicos formulados em cultivos agrícolas. Atualmente, o fipronil está entre os inseticidas mais comercializados no mundo, sendo que no Brasil compõe 61 formulações registradas e com uso autorizado em diversas culturas, a exemplo da soja. A aplicação foliar do fipronil em plantações pode expor abelhas forrageadoras a resíduos desses agrotóxicos gerando efeitos danosos a estes insetos não alvo, inclusive a morte de indivíduos e colônias inteiras. A ampla utilização do fipronil em culturas agrícolas e sua associação, nos últimos anos, em casos de perdas de colônias de abelhas no Brasil tem alertado sobre a necessidade de pesquisas que permitam subsidiar medidas para a proteção dos insetos polinizadores. Considerando que a sensibilidade a agrotóxicos é distinta em diferentes espécies de abelhas e que o Brasil possui polinizadores representantes da fauna nativa como as abelhas sem ferrão, torna-se necessária a inclusão dessas espécies em análises de risco de agrotóxicos. Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade aguda do fipronil, em *Apis mellifera* africanizada e *Scaptotrigona bipunctata* (representante da fauna brasileira), a fim de determinar a concentração e dose letal mediana (CL50 e DL50), respectivamente, em exposição oral e tópica de forrageiras. Os testes foram realizados com base em protocolos de toxicidade aguda oral (OECD 213) e tópica (OECD 214) para abelhas melíferas. Para isso estabeleceu-se cinco diluições baseadas na taxa de campo utilizada para soja (32g i.a. de fipronil/100L de calda). O produto comercial de fipronil utilizado foi o Nortox® 800WG: 80% ingrediente ativo (i.a.). Na exposição oral as concentrações para *A. mellifera* compreenderam um intervalo de 0,0016 a 0,32 ng i.a./μL de dieta e para *S. bipunctata* de 0,0008 a 0,032 ng i.a./μL de dieta. Na exposição tópica, as concentrações limitaram-se ao intervalo de 0,08 a 1,6 ng i.a./abelha para *A. mellifera* e de 0,016 a 0,32 ng i.a./abelha para *S. bipunctata*. As análises dos dados foram realizadas no programa R, e a taxa de mortalidade foi calculada com o pacote “drc”. Para o consumo de alimento foi adotado ANOVA ou Kruskal-Wallis (se paramétrico ou não-paramétrico). Os resultados do teste de toxicidade aguda oral determinaram a CL50 (em 72 horas): 0,0204 ng i.a./μL de dieta para *A. mellifera* e 0,0031 ng i.a./μL de dieta para *S. bipunctata*. O consumo de alimento pelas abelhas não diferiu entre concentrações testadas com fipronil e o controle, para ambas espécies, indicando que o produto não causou repelência ($P>0,05$). No teste de toxicidade aguda tópica os valores de DL50 em 72 horas foram de 0,3096 ng i.a./abelha para *A. mellifera* e de 0,0938 ng i.a./abelha para *S. bipunctata*. Estes dados revelam que a concentração de fipronil indicada para uso em lavoura de soja no Brasil é altamente tóxica para as abelhas. Além disso, ressalta-se que a abelha nativa avaliada neste estudo é mais suscetível que a abelha exótica. Estudos realizados com outras espécies brasileiras também evidenciam que as abelhas nativas são menos tolerantes ao inseticida fipronil que *A. mellifera*. Os autores enfatizam a urgência de incluir abelhas nativas nas análises de risco de agrotóxicos, e de colocar em prática políticas públicas e medidas para a proteção dos polinizadores.

palavras-chave: agrotóxico; ecotoxicologia; abelhas sem ferrão; Meliponini; *Apis mellifera*; *Scaptotrigona bipunctata*.

ABSTRACT

Bees are an important group of pollinators, necessary for the maintenance of biodiversity. Their populations are declining due to human actions, mainly due to the use of chemicals formulated in agricultural crops. Currently, fipronil is among the most commercialized insecticides in the world, with 61 formulations registered in Brazil and authorized for use in several crops, such as soybeans. The foliar application of fipronil in plantations can expose foraging bees to residues of these pesticides, generating harmful effects to these non-target insects, including the death of individuals and entire colonies. The widespread use of fipronil in agricultural crops and its association, in recent years, in cases of loss of bee colonies in Brazil has warned of the need for research to support measures to protect pollinating insects. Considering that the sensitivity to pesticides is different in species of bees and that Brazil has a high diversity of bees, it is necessary to include native species in risk analysis of pesticides. In this context, the present study aimed to evaluate the acute toxicity of fipronil, in Africanized *Apis mellifera* and *Scaptotrigona bipunctata* (representative of the Brazilian fauna), in order to determine the median concentration and lethal dose (LC50 and LD50), respectively, in oral exposure and topical forage bees. The tests were performed based on acute oral (OECD 213) and topical (OECD 214) toxicity protocols for honey bees. For this purpose, five dilutions were established based on the field rate used for soybeans (32g a.i. of fipronil / 100L of syrup). The commercial fipronil product used was Nortox® 800WG: 80% active ingredient (a.i.). In oral exposure, concentrations for *A. mellifera* comprised a range of 0.0016 to 0.32 ng a.i./μL of diet and for *S. bipunctata* from 0.0008 to 0.032 ng a.i./μL of diet. On topical exposure, concentrations were limited to the range of 0.08 to 1.6 ng a.i./bee for *A. mellifera* and 0.016 to 0.32 ng a.i./bee for *S. bipunctata*. Data analysis was performed using the R program, the mortality rate was calculated using the “drc” package. For food consumption, ANOVA or Kruskal-Wallis (whether parametric or non-parametric) was adopted. The results of the acute oral toxicity test determined the LC50 (in 72 hours): 0.0204 ng a.i./μL of diet to *A. mellifera* and 0.0031 ng a.i./μL of diet to *S. bipunctata*. The consumption of food by the bees did not differ between the control and the concentrations tested with fipronil, for both species, indicating that the product did not cause repellency ($P > 0.05$). In the acute topical toxicity test, the LD50 values in 72 hours were 0.3096 ng a.i./bee to *A. mellifera* and 0.0938 ng a.i./bee to *S. bipunctata*. These data reveal that the concentration of fipronil indicated for use in soybean crops in Brazil is highly toxic to bees. In addition, it should be noted that the native bee evaluated in this study is more susceptible than the exotic bee. Studies carried out with other Brazilian species also show that native bees are less tolerant to the insecticide fipronil than *A. mellifera*. The authors emphasize the urgency of including native bees in pesticide risk analysis, and of putting public policies and measures in place to protect pollinators.

keywords: pesticide; ecotoxicology; stingless bees; Meliponini; *Apis mellifera*; *Scaptotrigona bipunctata*.

APRESENTAÇÃO

O atual modelo de produção agrícola baseia-se na larga ocupação de ambientes naturais e na utilização de agrotóxicos. Esses fatores implicam diretamente em um declínio nas populações de abelhas. Embora não sejam os organismos-alvo desses produtos químicos, as abelhas estão constantemente sujeitas a exposição destes produtos nos agroecossistemas, seja por contato ou ingestão. O fipronil é um inseticida fenilpirazólico comumente utilizado para o controle de pragas agrícolas. Este composto, usado em culturas economicamente relevantes, a exemplo da soja, tem sido associado a mortandades em massa de abelhas melíferas no Brasil, cuja evidência está documentada em recentes relatórios governamentais do Rio Grande do Sul, e de outros estados brasileiros, sobre a perda de colônias.

O Brasil possui uma alta diversidade de abelhas. Além da espécie exótica *Apis mellifera* africanizada, dezenas de espécies sociais nativas, as abelhas sem ferrão (Meliponini), formam colônias com numerosos indivíduos a exemplo de *Scaptotrigona bipunctata*. Além de outras ameaças causadas por ações antrópicas, esses insetos estão expostos a produtos utilizados em agroecossistemas, seja porque visitam flores nas lavouras ou devido à deriva de produtos em suspensão. Devido a diferença de susceptibilidade de cada espécie de abelha a agrotóxicos torna-se necessária a avaliação da toxicidade de produtos amplamente utilizados em modelos biológicos que possam ser representativos da fauna nativa.

Neste sentido selecionamos o fipronil, um composto amplamente utilizado na agricultura de larga escala, e duas espécies de abelhas representativas pela sua importância econômica e ambiental, respectivamente *Apis mellifera* africanizada e *Scaptotrigona bipunctata*. Avaliamos a toxicidade aguda do fipronil tanto em exposição oral (ingestão) quanto tópica (contato) a fim de determinar, a CL50 e a DL50 (concentração e dose letal média que provoca mortalidade de 50% dos indivíduos) para as duas espécies. Com este conhecimento são disponibilizadas informações sobre a toxicidade do inseticida para abelhas e incentivadas ações e políticas que contribuam para conservação destes importantes insetos polinizadores.

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Toxicidade aguda do inseticida fipronil para *Apis mellifera* africanizada e *Scaptotrigona bipunctata*

Fernanda Gomes de Carvalho, Andressa Linhares Dorneles e Betina Blochtein

(Manuscrito formatado segundo as normas do periódico Apidologie)

1 Acute toxicity of the insecticide fipronil to Africanized *Apis mellifera* and *Scaptotrigona*

2 *bipunctata*

3 Fernanda Gomes de Carvalho^{1*}, Andressa Linhares Dorneles¹ e Betina Blochtein¹

4 ¹Laboratório de Entomologia, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia

5 Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

6 *Corresponding author

7 E-mail: f.gomes@edu.pucrs.br (FGC)

8 Short title: Toxicity of fipronil to bees

9 RESUMO

O fipronil é um inseticida fenilpirazólico utilizado contra pragas agrícolas. No Brasil está presente em uma variedade de formulações comerciais e é amplamente aplicado em diversas culturas, a exemplo da soja, e recentemente foi associado a perdas de colmeias de abelhas melíferas. Nas paisagens agrícolas brasileiras está uma diversa apifauna que pode ser atingida diretamente por agrotóxicos nas lavouras, ou pelo efeito de deriva de aplicações em suspensão. A suscetibilidade de distintas espécies de abelhas difere em resposta a agrotóxicos, portanto modelos animais representativos de abelhas nativas devem ser incluídos nas análises de risco destes produtos. O presente estudo avaliou a toxicidade aguda do inseticida fipronil para as espécies *Apis mellifera* africanizada e para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata*, tanto em exposição oral quanto tópica a fim de determinar, respectivamente, a CL50 e DL50. Os resultados demonstraram que o fipronil é altamente tóxico para as abelhas e evidenciaram que a espécie nativa é menos tolerante ao inseticida fipronil do que *A. mellifera*.

***Apis mellifera* africanizada / *Scaptotrigona bipunctata* / Meliponini / fenilpirazol / ensaio de toxicidade**

26 INTRODUÇÃO

A polinização é essencial para manutenção da biodiversidade em ambientes naturais e na produção de cultivos agrícolas (Pires e Maués, 2020). Nesse processo os agentes polinizadores são fundamentais para a transferência dos grãos de pólen para o estigma das flores e auxiliam na reprodução efetiva desses organismos (IPBES, 2016; BPBES, 2019). As abelhas atuam como os principais polinizadores de uma grande

diversidade de plantas, e a eficiência desse grupo está relacionada à dependência dos recursos florais (pólen e néctar) desde o estágio larval até a fase adulta. Além disso, esses indivíduos possuem adaptações morfológicas, comportamentais e fisiológicas que fortalecem a localização e exploração desses recursos (Klein et al., 2007; Potts et al., 2010).

Com a intensificação da agricultura, os serviços ecossistêmicos prestados pelos animais (como a polinização) têm sido gradativamente ameaçados (Sánchez-Bayo e Wyckhuysb, 2019). Os polinizadores silvestres e domesticados têm mostrado reduções drásticas em suas populações em diferentes regiões do mundo, as quais devem-se principalmente à ocupação intensa dos meios naturais pelo homem (Watanabe, 2014; Marshman et al., 2019). As abelhas são um grupo muito suscetível a essas alterações ambientais por necessitarem de áreas de floresta para nidificação, além disso estão sujeitas à ação de agrotóxicos próximas a seus habitats (Allen-Wardell et al., 1998; Krupke et al., 2012).

No Brasil, além da espécie *Apis mellifera* africanizada, são conhecidas 244 espécies descritas de abelhas sem ferrão (Pedro, 2014). No entanto, de acordo com Freitas et al. (2009) as abelhas nativas vêm desaparecendo com as grandes áreas de monocultura e principalmente, com a fragmentação de habitats e uso de agrotóxicos. O Brasil tem se mantido entre os cinco maiores consumidores de inseticidas do mundo, tendo o consumo de princípios ativos aumentado(152%) de 28.382 para 71.663 toneladas métricas em 15 anos (dos Santos et al., 2018). As abelhas, embora não sejam os organismos-alvo desses produtos, estão vulneráveis a contaminação devido a atividade de forrageamento em áreas agrícolas (Oliveira et al., 2016).

Os inseticidas podem afetar as abelhas principalmente por duas vias: a) ingestão, através de resíduos no pólen e/ou néctar; b) contato, a partir de partículas suspensas no ar que entram em contato com o corpo da abelha (Mullin et al., 2010; Dively e Kamel, 2012). Os efeitos dessa exposição variam de alterações a longo prazo que provocam danos ao funcionamento da colônia e longevidade dos indivíduos até a morte causada por toxicidade aguda (Celli e Maccagnani, 2003; Malaspina et al., 2008; Johnson, 2015; Qi et al., 2020).

As avaliações de risco de agrotóxicos por toxicidade aguda usualmente seguem o Protocolo Internacional para Testes Químicos da Organização para Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD). Esses testes determinam o efeito letal de produtos químicos em um curto período de tempo de exposição bem como as curvas de dose-resposta, tanto para administração oral quanto tópica. Com isso se obtém a informação sobre a concentração ou dose letal mediana (CL50 ou DL50) associada à mortalidade de 50% dos indivíduos. Os experimentos de toxicidade aguda são analisados a partir da taxa de mortalidade registrada em até 96 horas (OECD, 1998a; OECD, 1998b).

Até o presente momento, a maioria dos estudos de toxicologia de inseticidas com abelhas têm se concentrado na vulnerabilidade da abelha doméstica, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 devido a sua importância econômica em escala global (Brittain e Potts, 2010). No entanto, essas abelhas nem sempre são os polinizadores mais eficazes em muitas regiões. As abelhas sem ferrão, por exemplo, caracterizam os sistemas dos trópicos e desempenham um papel importante como polinizadores dessas regiões (Heard, 1999; Ramírez et al., 2018).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) reconhece a necessidade de inclusão de abelhas nativas em análises de risco de agrotóxicos. Diante desse cenário o IBAMA propôs uma seleção de espécies representativas das abelhas nativas brasileiras para avaliação de risco, a exemplo da *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Pires et al., 2018). Conhecida popularmente como tubuna, apresenta ampla distribuição na América do Sul e está entre as abelhas mais criadas no Brasil sendo encontrada nos biomas Pampa, Pantanal e Mata Atlântica (Venturieri et al., 2011; Camargo e Pedro, 2013). Essa espécie possui ninhos populosos (Nogueira-Neto, 1997) e se adapta bem às condições de laboratório (Dorneles et al., 2021).

Um dos fatores para o declínio de populações de abelhas silvestres e manejadas ocorre devido à falta de recursos, causado principalmente pela conversão da agricultura em monoculturas (St. Clair et al., 2020). Associado a este fator, De Groot e colaboradores (2021) forneceram evidências de que a diminuição na produção de mel pode estar ligada à intensificação da monocultura de soja. A produção de soja no Brasil (maior exportador e maior produtor no mundo) (USDA, 2021) está associada diretamente com a perda de habitats naturais em grandes áreas (Fearnside, 2001; Lima et al., 2019). Além disso, nas paisagens agrícolas que são dominadas por monoculturas normalmente as abelhas preferem fontes de pólen de plantas não cultivadas, que, frequentemente, por estarem próximas dos cultivos, apresentam resíduos de agrotóxicos (Long e Krupke, 2016).

O forrageamento de abelhas em áreas de monocultura, a exemplo da soja, e nas paisagens próximas, acarreta em exposição aos inseticidas (Krupke et al., 2012). As abelhas forrageiam nessas áreas porque as flores da soja são atrativas, seu néctar é de alta qualidade, e muitas vezes há preferência comparado a outras fontes (Erickson, 1976;

101 Gazzoni, 2017). No Brasil a atividade agrícola é importante economicamente, e ancorada
102 na produção diversificada de culturas, com destaque para a soja (Martinelli et al., 2017).
103 O modelo agrícola vigente inclui o uso intensivo de agrotóxicos, que inclusive supõe-se
104 a relação com a perda de milhares de colmeias (Pires et al., 2016).

105 Neonicotinoides e fipronil representam aproximadamente um terço do mercado
106 mundial de inseticidas (Simon-Delso et al., 2015). O fipronil foi descoberto e
107 desenvolvido pela empresa francesa Rhône-Poulenc Agro (agora Bayer CropScience)
108 entre 1985 e 1987, chegando ao mercado em 1993. É um inseticida fenilpirazólico que
109 age interferindo no funcionamento pré e pós-sináptico dos canais de cloro controlados
110 pelos neurotransmissores GABA (ácido gama-aminobutírico), resultando em
111 hiperexcitação neuronal, levando o inseto a paralisia severa e morte (Cole et al., 1993;
112 Simon-Delso et al., 2015).

113 O ingrediente ativo fipronil está presente em uma variedade de formulações
114 comerciais, com indicações para aplicação foliar, no solo e no tratamento de sementes
115 (FAO, 2009). No Brasil o fipronil está registrado em 61 produtos formulados e tem uso
116 agrícola autorizado para as culturas de acácia-negra, algodão, arroz, batata, cana-de-
117 açúcar, cevada, eucalipto, feijão, milho, pastagens, soja, sorgo e trigo (MAPA, 2021).
118 Embora ainda seja utilizado no Brasil, o fipronil é estritamente regulado em outros países.
119 Na China e em países da União Europeia seu uso foi proibido em cultivos agrícolas
120 (Kathage et al., 2017; Li et al., 2020). Na França proibiram o inseticida por ter provocado
121 mortandade em massa nos apiários da região (Holder et al., 2018). Notificações
122 associadas a perdas de colmeias no Brasil (para abelhas africanizadas e nativas) apontam
123 para a presença de diversos agrotóxicos, sendo que o inseticida fipronil foi o mais
124 mencionado (Castilhos et al., 2019a). Em outro artigo de Castilhos e colaboradores

(2019b) para fins de análises toxicológicas das perdas de colmeias detectaram múltiplas contaminações com índices altos de resíduos de fipronil, confirmando as notificações previamente estabelecidas.

A maioria dos estudos de toxicidade para abelhas têm sido conduzidos com ingredientes ativos. Entretanto, evidências sugerem que as fórmulas comerciais podem ser mais nocivas para as abelhas do que os ingredientes ativos isolados, devido a presença de inertes adicionados nessas formulações que podem potencializar a toxicidade do produto químico (Pereira et al., 2009; Nagy et al., 2020). Outro ponto a ressaltar é que os trabalhos focam nas abelhas melíferas europeias, e há poucos estudos sobre as abelhas africanizadas. No Brasil, temos a presença da *A. mellifera* africanizada, que é um híbrido das subespécies europeias com *A. mellifera scutellata* (oriunda da África) introduzida em 1956 (Ruttner, 2013).

O fipronil é um inseticida que está associado a recentes casos de mortandade de abelhas no Brasil e é um dos produtos mais comercializados contra pragas agrícolas. Considerando sua utilização em diversos cultivos agrícolas no Brasil, como na soja, que é atrativa às abelhas, torna-se necessária a avaliação da sua toxicidade para *A. mellifera* africanizada e em um modelo biológico representativo da apifauna neotropical.

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade aguda do fipronil, em forrageiras de *Apis mellifera* africanizada e *Scaptotrigona bipunctata* (representante da fauna brasileira), a fim de determinar a CL50 e DL50, respectivamente, em exposição oral e tópica e com isso subsidiar políticas e ações para a proteção destes importantes polinizadores.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de abelhas e manutenção em laboratório

As abelhas adultas forrageiras foram obtidas de colônias saudáveis, em dias não chuvosos com temperatura acima de 28°C, no período de primavera-verão. Foram utilizadas três colônias diferentes (= número de réplicas) para todos experimentos a fim de garantir a variabilidade genética. As forrageiras de *A. mellifera* foram coletadas de colônias provenientes do apiário da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e as de *S. bipunctata* do meliponário da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. As coletas foram feitas mantendo a aleatoriedade na saída das colônias. Após coletadas as abelhas foram mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) em temperatura ($28\pm1^{\circ}\text{C}$ para *S. bipunctata* e $32\pm1^{\circ}\text{C}$ para *A. mellifera*) e umidade relativa ($70\pm10\%$) controladas. As gaiolas experimentais utilizadas para *S. bipunctata* consistiram em potes plásticos de 250mL perfurados para garantir a circulação de ar. Microtubos plásticos de 1,5mL furados nas laterais foram utilizados como alimentadores (Fig 1a). Para *A. mellifera* foram utilizadas caixas de madeira teladas (12 x 11,5 x 8,5 cm) devido uma melhor adaptação dos indivíduos. Os alimentadores utilizados foram tubos do tipo Falcon de 15 mL perfurados na extremidade inferior (Fig 1b).

Preparo das concentrações

O produto utilizado nos testes foi o fipronil - Nortox® 800WG: 80% ingrediente ativo (i.a.), registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 10412, classificação toxicológica I (extremamente tóxico) e classificação do potencial de periculosidade ambiental II (produto muito perigoso ao meio ambiente). A solução foi calculada com base na taxa de campo utilizada para a soja (40g p.c./100L de calda ou 32g i.a./100L de calda); p.c.= produto comercial; i.a. = ingrediente ativo. A solução-mãe foi preparada em água destilada em uma concentração de 0,01g de fipronil para 25mL de água destilada a fim de proceder a realização das cascatas de diluições. Em todo o início de teste era preparada uma nova solução-mãe. Foram calculadas cinco concentrações mantendo série geométrica de fator 2 que compreendessem de 0 a 100% de mortalidade dos indivíduos.

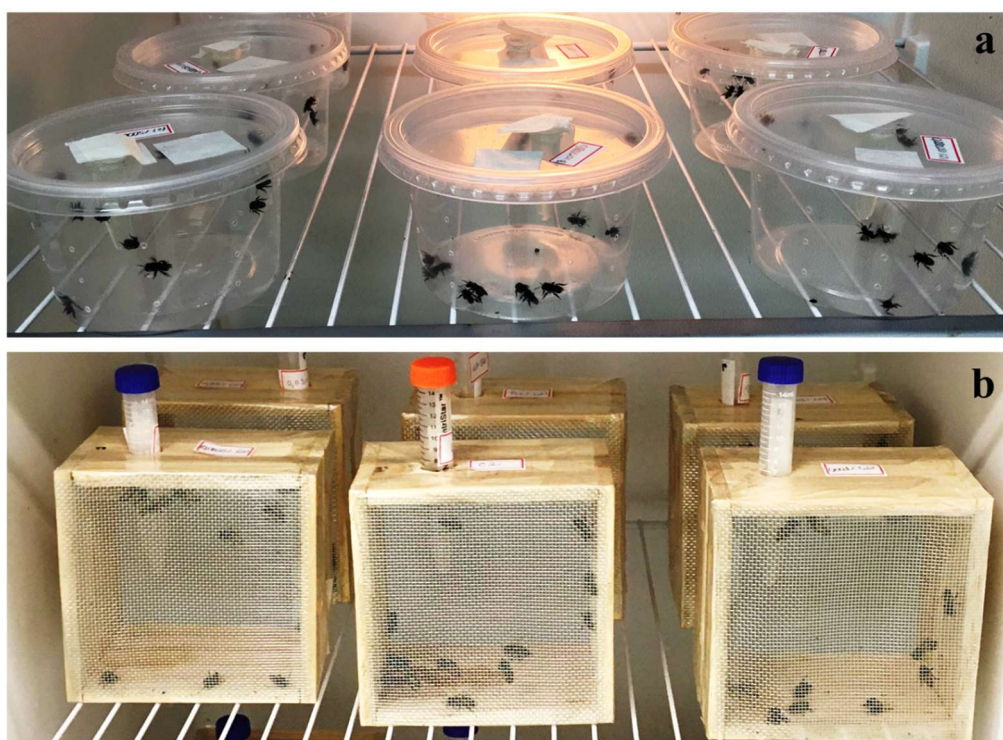


Fig. 1 Gaiolas experimentais dentro de câmaras de criação **a.** Experimento com *S. bipunctata* **b.** Experimento com *A. mellifera* (Imagem: O Autor)

Testes de toxicidade aguda

186

187 Os testes de toxicidade aguda foram realizados conforme protocolos
188 internacionais que estabelecem métodos laboratoriais para avaliar a toxicidade aguda oral
189 (OECD 213) e tópica (OECD 214) de produtos químicos para abelhas melíferas (OECD,
190 1998a; OECD, 1998b). A metodologia também foi utilizada para a abelha sem ferrão *S.*
191 *bipunctata*.

192

193 **Exposição oral**

194

195 O teste de toxicidade oral aguda foi realizado a partir das concentrações diluídas
196 em solução de sacarose (1:1) fornecidas durante 6 horas de exposição. Foram seis grupos
197 experimentais, um controle (sem adição de inseticida) e cinco concentrações com o
198 fipronil. Todos os grupos obtiveram três réplicas com 10-12 abelhas por réplica. Após as
199 6 horas de exposição, o alimentador era trocado por um novo contendo somente solução
200 de sacarose. As concentrações para *A. mellifera* compreenderam um intervalo de 0,0016
201 ng i.a./μL de dieta a 0,32 ng i.a./μL de dieta e para *S. bipunctata* de 0,0008 ng i.a./μL de
202 dieta a 0,032 ng i.a./μL de dieta.

203

204 **Exposição tópica**

205

206 O teste tópico de toxicidade aguda foi realizado com as concentrações diluídas em
207 acetona. As abelhas foram anestesiadas em freezer para a aplicação de 1μL das soluções
208 sobre a superfície dorsal do tórax com auxílio de micro-aplicador (seringa de Hamilton).
209 Foram estabelecidos sete grupos experimentais: um controle (sem adição de nenhum

solvente), um controle-solvente (com adição de acetona) e cinco concentrações. Todos os grupos foram triplamente replicados e continham 10-12 abelhas por réplica. Após as doses aplicadas, o teste prosseguiu nas gaiolas experimentais em câmaras de criação com alimentação a base de solução de sacarose *ad libitum*. As concentrações para *A. mellifera* compreenderam um intervalo de 0,08 ng i.a./abelha a 1,6 ng i.a./abelha e de *S. bipunctata* de 0,016 ng i.a./abelha a 0,32 ng i.a./abelha.

Registro de dados

Os dados de mortalidade foram anotados diariamente até 72 horas. O consumo de alimento para o teste oral agudo foi anotado no início do experimento e após as 6 horas de exposição para avaliar possível repelência do produto químico. Comportamentos anormais como: paralisia, tremores, hiperexcitação, permanência em decúbito dorsal (com movimento das pernas) também foram anotados em caso de observação.

Análise dos dados

Todas as análises foram realizadas no programa R. A taxa de mortalidade foi analisada utilizando o pacote “drc” da função *two-parameter log-logistic* para determinação da CL50 e DL50. Os registros relativos ao consumo de alimento foram primeiramente verificados quanto à normalidade dos dados pela função *shapiro.test*, e após isso utilizou-se a função *anova* (se paramétrico) ou *kruskal.test* (se não paramétrico). Também foram comparados pela função *anova* o controle e controle-solvente (tópico).

RESULTADOS

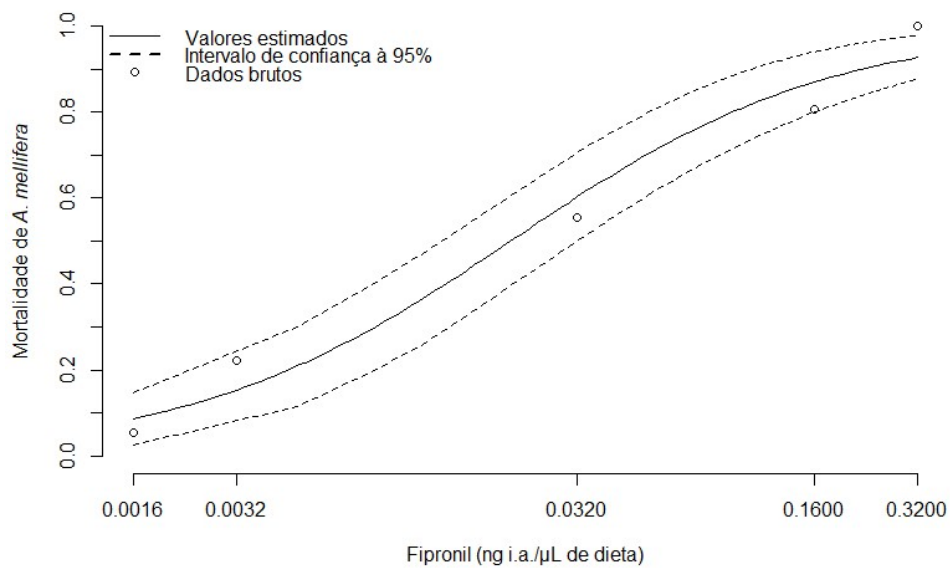
A CL50 e a DL50 de fipronil para *A. mellifera* e *S. bipunctata* foram calculadas a partir dos dados de mortalidade de 72 horas. Foram obtidos diferentes valores para as duas espécies nos testes de toxicidade aguda oral e tópica.

Teste oral agudo

A CL50 encontrada para *A. mellifera* foi de 0,0204 ng i.a./ μ L de dieta e para *S. bipunctata* foi de 0,0031 ng i.a./ μ L de dieta (Tabela 1). É possível observar nas curvas de dose-resposta o valor aproximado da concentração que resulta na mortalidade de 50% dos indivíduos das respectivas espécies (Fig. 2 e 3).

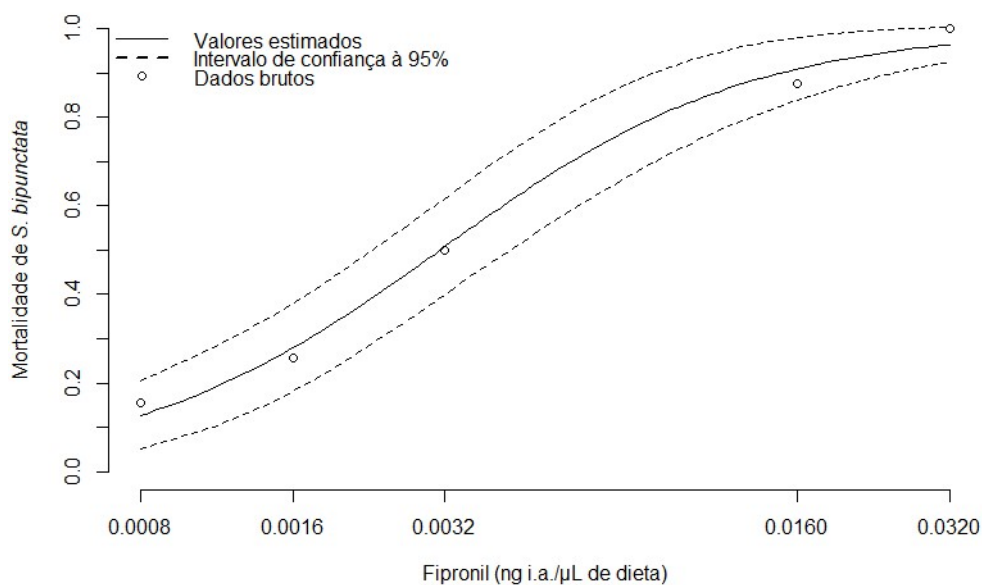
Tabela 1 Valores de CL50 de fipronil registrados em 72 horas para operárias de *A. mellifera* e *S. bipunctata*

Inseticida	Espécies	N	CL50 (I.C. 95%) ng i.a./ μ L de dieta	χ^2	P
Fipronil	<i>A. mellifera</i>	210	0,0204 (0,0113 - 0,0296)	6,260	0,0996
	<i>S. bipunctata</i>	210	0,0031 (0,0022 - 0,0040)	1,940	0,585



250

251 **Fig. 2** Toxicidade oral aguda de fipronil para forrageiras de *A. mellifera* em 72 horas (taxa
252 de mortalidade por concentração do produto químico em ng i.a./μL de dieta)



253

254 **Fig. 3** Toxicidade oral aguda de fipronil para forrageiras de *S. bipunctata* em 72 horas
255 (taxa de mortalidade por concentração do produto químico em ng i.a./μL de dieta)

Consumo de alimento

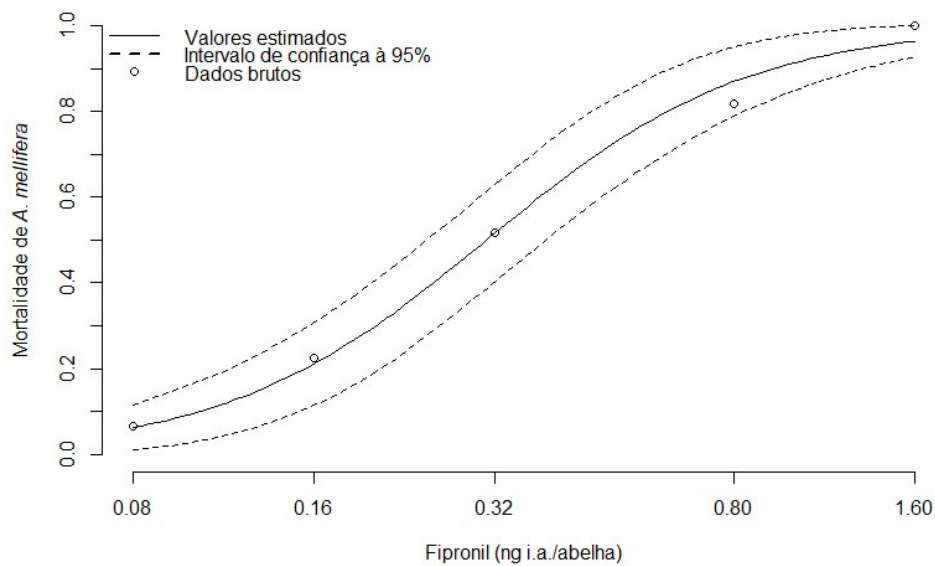
Não houve diferença no consumo de alimento entre e as concentrações testadas com fipronil e o controle (sem adição de inseticida) para *A. mellifera* e *S. bipunctata* ($P > 0,05$) indicando que o inseticida não causou repelência.

Teste tópico agudo

A DL50 de fipronil para *A. mellifera* foi de 0,3096 ng i.a./abelha enquanto para *S. bipunctata* foi de 0,0938 ng i.a./abelha (Tabela 2). Nas curvas de dose-resposta observase os valores aproximados das doses que causam 50% de mortalidade das abelhas testadas em exposição tópica (Fig. 4 e 5). Não houve diferença entre o controle e o controle-solvente ($P > 0,05$).

Tabela 2 Valores de DL50 de fipronil encontrados para abelhas forrageiras de *A. mellifera* e *S. bipunctata* em 72 horas

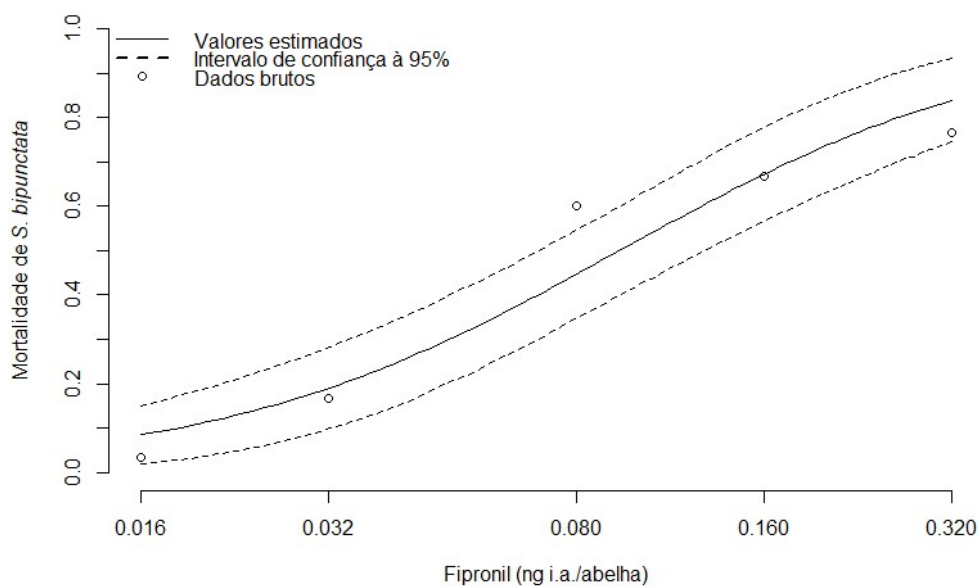
Inseticida	Espécies	N	DL50 (I.C. 95%) ng i.a./abelha	χ^2	P
Fipronil	<i>A. mellifera</i>	210	0,3096 (0,2410 - 0,3782)	2,045	0,5632
	<i>S. bipunctata</i>	210	0,0938 (0,0664 - 0,1212)	5,155	0,1608



273

274 **Fig. 4** Toxicidade tóxica aguda de fipronil em 72 horas para forrageiras de *A. mellifera*

275 (taxa de mortalidade por dose de inseticida em ng i.a./abelha)



276

277 **Fig. 5** Toxicidade tóxica aguda de fipronil em 72 horas para forrageiras de *S. bipunctata*

278 (taxa de mortalidade por dose de inseticida em ng i.a./abelha)

279

Comportamentos observados

No teste oral agudo de fipronil para *S. bipunctata* na concentração de 0,016 ng i.a./μL de dieta em 48 horas foram observados os seguintes comportamentos: tremores e permanência em decúbito dorsal. No teste tópico agudo nas doses mais altas de fipronil para *A. mellifera* (1,60 e 0,80 ng i.a./abelha) em 24 horas também foram observados os comportamentos acima descritos.

DISCUSSÃO

Considerando as concentrações e doses que matam 50% dos indivíduos (CL50 de fipronil para *A. mellifera*: 0,0204 ng i.a./μL de dieta; *S. bipunctata*: 0,0031 ng i.a./μL de dieta e DL50 de fipronil para *A. mellifera*: 0,3096 ng i.a./abelha; *S. bipunctata*: 0,0938 ng i.a./abelha) é possível notar que o valor utilizado em campo de fipronil para soja (40g p.c./100L ou 32g i.a./100L de calda) é consideravelmente maior que as respectivas CL50 e DL50. Em uma exposição oral o valor utilizado em campo de fipronil para soja é aproximadamente 16.000x maior que a CL50 de *A. mellifera* e 100.000x maior que a de *S. bipunctata*. Em uma exposição tópica esse valor é aproximadamente 1.000x maior que a DL50 de *A. mellifera* e 3.500x maior que a DL50 de *S. bipunctata*. Pode-se verificar que a quantidade de fipronil utilizada em campo para soja no Brasil é altamente tóxica para as abelhas exóticas e nativas,

Cabe ressaltar que, os valores encontrados de toxicidade aguda para indivíduos de *S. bipunctata* foram menores que o da espécie exótica, indicando que essa espécie nativa é mais suscetível que *A. mellifera*. Outros estudos realizados com *Melipona scutellaris*

(Lourenço et al., 2012), *Scaptotrigona postica* (Jacob et al., 2013) e *Partamona helleri* (Farder-Gomes et al., 2021) também evidenciaram que as espécies nativas possuem menos tolerância ao inseticida fipronil do que *A. mellifera*.

Os sintomas de intoxicação detectados neste estudo (tremores e permanência em decúbito dorsal) também foram constatados por Colin e colaboradores (2004). Os autores verificaram em um estágio subagudo (ou seja, sem mortalidade, mas com sinais de deficiência) efeitos na atividade motora (convulsões e paralisia) para *A. mellifera* expostas ao fipronil. Esse tipo de comportamento leva a incapacidade das operárias de realizarem as tarefas de forrageamento.

Outro ponto em comum das espécies de abelhas estudadas neste estudo com *M. scutellaris* (Lourenço et al. 2012) e *P. helleri* (Farder-Gomes et al. 2021) foi a ausência de repelência à alimentação com fipronil. Essas respostas indicam que a consequência da exposição do fipronil na colônia pode ser intenso, uma vez que as abelhas não evitam os alimentos contaminados e ainda podem dispersá-los por trofalaxia para outros indivíduos da colônia. No presente estudo, o único recurso alimentar fornecido às abelhas foi a dieta com inseticida, na natureza as abelhas obtém recursos em flores de diversas espécies e poderiam ter outras opções de alimentação sem inseticida. Entretanto, Kessler e colaboradores (2015) avaliaram indivíduos de *Bombus terrestris* e *A. mellifera* e as abelhas apresentaram preferência por alimentos com inseticidas neonicotinoides, sugerindo que mesmo com mais recursos não evitariam a alimentação com inseticida.

Decourtye e colaboradores (2005) avaliaram a exposição oral aguda do ingrediente ativo de fipronil (98,5% de pureza) para *A. mellifera* europeia e encontraram a DL50 de 6 ng/abelha (33µL/abelha/dia) em 48 horas. No presente estudo encontramos uma CL50 de 0,0204 ng i.a./µL de dieta para *A. mellifera* africanizada em 72 horas. Pode-

se inferir que a formulação comercial desse produto químico seja mais nociva a essas abelhas do que o ingrediente ativo, devido a um menor valor encontrado que causa efeitos de toxicidade aguda (Pereira et al., 2009; Nagy et al., 2020). Outro cenário que pode-se deduzir é que as abelhas melíferas africanizadas são mais suscetíveis ao fipronil do que as abelhas melíferas europeias. Situação análoga foi relatada para outro inseticida, o ciflutrina, que foi três vezes mais tóxico para as abelhas africanizadas do que para as europeias (Elzen et al., 2003).

Outro estudo avaliou a toxicidade aguda (via tópica e oral) do ingrediente ativo de fipronil (95% de pureza) para operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada (Roat et al., 2013). A CL50 e a DL50 encontradas em 24 horas (1,27 ng i.a./μL de dieta e 1,06 ng i.a./abelha) foram maiores comparadas com a CL50 e a DL50 de forrageiras de *A. mellifera* africanizada em 72 horas (0,0204 ng i.a./μL de dieta 0,3096 ng i.a./abelha) verificadas na presente pesquisa. Este resultado indica que as abelhas forrageiras são mais suscetíveis que as recém-emergidas, e esta resposta pode estar associada a alteração do metabolismo relacionada com a idade (Rinkevich et al., 2015). Outra possibilidade para explicar esta diferença de resposta ao produto seria que a fórmula comercial é mais tóxica que o ingrediente ativo, corroborando que os inertes podem potencializar a toxicidade dos produtos químicos (Pereira et al., 2009). Em uma revisão sistemática Nagy e colaboradores (2020) demonstraram que em 67% dos trabalhos analisados a formulação comercial foi mais tóxica que o ingrediente ativo.

Estudos de toxicidade aguda com abelhas nativas foram realizados mediante exposição do ingrediente ativo de fipronil (95% de pureza) para forrageiras de *M. scutellaris* em 48 horas (Lourenço et al., 2012) e para recém-emergidas de *S. postica* em 24 horas (Jacob et al., 2013). Outro estudo com a fórmula comercial Tuit® Florestal (80%

de pureza) avaliou a CL50 em 24 horas para operárias de *P. helleri* (Farder-Gomes et al., 2021). Os valores encontrados de CL50 e DL50 para *M. scutellaris* (0,011ng i.a./μL de dieta e 0,41 ng i.a./abelha) e para *S. postica* (0,24 ng i.a./μL de dieta e 0,54ng i.a./abelha) e a CL50 para *P. helleri* (0,28 ng i.a./μL) foram maiores que os registrados no presente estudo para *S. bipunctata*. Analisando as quatro espécies de abelhas nativas verifica-se que *S. bipunctata* é a mais suscetível para o fipronil em exposição oral aguda que as demais espécies (CL50 de *S. bipunctata* em 72 horas: 0,0031 ng i.a./μL de dieta). Comparando os produtos químicos avaliados para *P. helleri* e *S. bipunctata* pode-se inferir que o Nortox® 800WG é mais tóxico que o Tuit® Florestal para as abelhas.

É notória a diferença de susceptibilidade entre as espécies de abelhas diante da exposição a um mesmo inseticida. Nota-se também que a resposta está atrelada ao estágio de vida testado bem como ao tipo de produto, se em fórmula comercial ou em ingrediente ativo isolado. É relevante ressaltar que os testes toxicológicos podem variar entre laboratórios, por isso a importância de seguir protocolos que padronizam os métodos de análise, a fim de minimizar as variáveis aleatórias (Lemke, 1981).

Evidenciada a toxicidade aguda do fipronil para abelhas, o presente estudo reforça que a espécie de abelha nativa é mais suscetível que a abelha doméstica exótica. Esta conclusão soma-se a outros estudos reiterando que abelhas nativas devem ser prioritárias em avaliações de risco de agrotóxicos no Brasil, devido sua alta susceptibilidade a esses produtos. Por fim, tendo em vista o uso de formulações comerciais altamente tóxicas com fipronil na agricultura brasileira, faz-se necessária a avaliação sobre a sua utilização, considerando-se o risco de exposição a abelhas e em favor da conservação dos polinizadores.

376 **AGRADECIMENTOS**

377

378 Agradecemos ao Msc. Aroni Sattler da Faculdade de Agronomia da Universidade
379 Federal do Rio Grande do Sul pela coleta e manejo das colônias de *A. mellifera*, à Msc.
380 Jenifer Dias Ramos e à Msc. Nicole Luize Garcia da Silva do Laboratório de Entomologia
381 da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo auxílio no preparo de
382 soluções utilizados nos experimentos e à Isabelle Wrague pelo apoio na realização dos
383 testes.

384 REFERÊNCIAS

- 385 Allen-Wardell, G., Bernhardt, P., Bitner, R., Burquez, A., Buchmann, S., Cane, J., Walker,
386 S. (1998). The potential consequences of pollinator declines on the conservation of
387 biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation biology*, 8-17.
- 388 BPBES. (2019). Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de
389 Alimentos no Brasil. Wolowski, M., et al. (Org.). 1ª edição, São Carlos, SP: Editora
390 Cubo. 184 páginas. <http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>.
- 391 Brittain, C., Potts, S. G. (2011). The potential impacts of insecticides on the life-history traits
392 of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology*, 12(4), 321-
393 331.
- 394 Camargo, J. M. F., Pedro, S. R. M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S.,
395 Urban, D., Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the
396 Neotropical Region [online] www.moure.cria.org.br/catalogue (acesso em 08 abr.
397 2021).
- 398 Castilhos, D., Bergamo, G. C., Gramacho, K. P., Gonçalves, L. S. (2019a) Bee colony losses
399 in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie*, 1-10.
- 400 Castilhos, D., Dombroski, J. L., Bergamo, G. C., Gramacho, K. P., Gonçalves, L. S. (2019b).
401 Neonicotinoids and fipronil concentrations in honeybees associated with pesticide use
402 in Brazilian agricultural areas. *Apidologie*, 50(5), 657-668.
- 403 Celli, G., Maccagnani, B. (2003). Honey bees as bioindicators of environmental pollution.
404 *Bulletin of Insectology*, 56(1), 137-139.
- 405 Cole, L. M., Nicholson, R. A., Casida, J. E. (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at
406 the GABA-gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 46(1), 47-
407 54.
- 408 Colin, M. E., Bonmatin, J. M., Moineau, I., Gaimon, C., Brun, S., Vermandere, J. P. (2004).
409 A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the
410 sublethal effects induced by systemic insecticides. *Archives of environmental*
411 *contamination and toxicology*, 47(3), 387-395.
- 412 De Groot, G. S., Aizen, M. A., Sáez, A., Morales, C. L. (2021). Large-scale monoculture
413 reduces honey yield: the case of soybean expansion in Argentina. *Agriculture*,
414 *Ecosystems & Environment*, 306, 107203.
- 415 Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Le Menach, K., Budzinski, H., Cluzeau, S.,
416 Pham-Delegue, M. H. (2005). Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on
417 olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Archives of*
418 *environmental contamination and toxicology*, 48(2), 242-250.
- 419 Dively, G. P., Kamel, A. (2012). Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop
420 and their potential exposure to pollinators. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4449-4456.
421 <https://doi.org/10.1021/jf205393x>
- 422 Dorneles, A. L., de Souza Rosa-Fontana, A., Dos Santos, C. F., Blochtein, B. (2021). Larvae
423 of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide
424 develop into lighter, smaller and deformed adult workers. *Environmental Pollution*, 272,
425 116414. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116414>.

426 Dos Santos, C. F., Otesbelgue, A., Blochtein, B. (2018). The dilemma of agricultural
 427 pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PloS one*, 13(7),
 428 e0200286.

429 Elzen P. J., Elzen G. W., Rubink W. (2003). Comparative susceptibility of European and
 430 African bee ecotypes to several insecticide classes. *Southwestern Entomologist*.
 431 28(4):255–60.

432 Erickson, E. H. (1976). Bee pollination of soybeans. In *Proceedings of the Sixth Soybean*
 433 *Seed Research Conference*.

434 Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Martins, G. F.,
 435 Serrão, J. E. (2021). Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and
 436 impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri*
 437 Friese (Hymenoptera: Apidae). *Science of The Total Environment*, 774, 145679.

438 FAO. (2009). FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides. [online]
 439 [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation01/08_Fipronil.pdf)
 440 [Evaluation01/08_Fipronil.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation01/08_Fipronil.pdf) (acesso em 03 abr. 2021).

441 Fearnside, P. M. (2001). Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil.
 442 *Environmental Conservation*, 23-38.

443 Freitas, B. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., Medina, L. M., Kleinert, A. D. M. P., Galetto, L.,
 444 Nates-Parra, G., Quezada-Euán, J. J. G. (2009). Diversity, threats and conservation of
 445 native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40(3), 332-346.

446 Gazzoni, D. L. (2017). *Soja e abelhas*. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

447 Heard, T. A. (1999). The role of stingless bees in crop pollination. *Annual review of*
 448 *entomology*, 44(1), 183-206.

449 Holder, P. J., Jones, A., Tyler, C. R., Cresswell, J. E. (2018). Fipronil pesticide as a suspect
 450 in historical mass mortalities of honeybees. *Proceedings of the National Academy of*
 451 *Sciences*, 115(51), 13033-13038.

452 IPBES. (2016). Summary for policymakers of the assessment report of the
 453 Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on
 454 pollinators, pollination and food production. S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca, H. T.
 455 Ngo, J. C. Biesmeijer, T. D. Breeze, L. V., et al., (eds.). Secretariat of the
 456 Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services,
 457 Bonn, Germany.

458 Jacob, C. R. O., Soares, H. M., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O. (2013).
 459 Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. *Bulletin*
 460 *of Environmental Contamination and Toxicology*, 90(1), 69-72.

461 Johnson, R.M. (2015). Honey bee toxicology. *Ann. Rev. Entomol.* 60, 415-434.
 462 <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011613-162005>.

463 Kathage, J., Castañera, P., Alonso-Prados, J. L., Gómez-Barbero, M., Rodríguez-Cerezo, E.
 464 (2018). The impact of restrictions on neonicotinoid and fipronil insecticides on pest
 465 management in maize, oilseed rape and sunflower in eight European Union regions. *Pest*
 466 *management science*, 74(1), 88-99.

467 Kessler, S. C., Tiedeken, E. J., Simcock, K. L., Derveau, S., Mitchell, J., Softley, S., &
 468 Wright, G. A. (2015). Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature*,
 469 521(7550), 74-76.

470 Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A.,
 471 Kremen, C., Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes
 472 for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303-
 473 313.

474 Krupke, C. H., Hunt, G. J., Eitzer, B. D., Andino, G., Given, K. (2012). Multiple routes of
 475 pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. *PLoS one*, 7(1),
 476 e29268.

477 Lemke, A. E. (1981). Interlaboratory comparison: Acute testing set. US Environmental
 478 Protection Agency, Research and Development, Environmental Research Laboratory.

479 Li, X., Ma, W., Li, H., Zhang, Q., Ma, Z. (2020). Determination of residual fipronil and its
 480 metabolites in food samples: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 185-
 481 195.

482 Lima, M., da Silva Junior, C. A., Rausch, L., Gibbs, H. K., Johann, J. A. (2019).
 483 Demystifying sustainable soy in Brazil. *Land Use Policy*, 82, 349-352.

484 Long, E. Y., Krupke, C. H. (2016). Non-cultivated plants present a season-long route of
 485 pesticide exposure for honey bees. *Nature communications*, 7(1), 1-12.

486 Lourenço, C. T., Carvalho, S. M., Malaspina, O., Nocelli, R. C. F. (2012). Oral toxicity of
 487 fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811).
 488 *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 89(4), 921-924.

489 Malaspina, O., Souza, T. F., Zacarin, E. C. M. S., Cruz, A. S., Jesus, D. (2008). Efeitos
 490 provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. VIII Encontro Sobre Abelhas.
 491 Resumos. Ribeirão Preto: FUNPEC, 41-48.

492 MAPA (2021). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT: Sistemas
 493 de Agrotóxicos Fitossanitários. [online]
 494 http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons (acesso em 12
 495 abr. 2021).

496 Marshman, J., Blay-Palmer, A., Landman, K. (2019). Anthropocene crisis: climate change,
 497 pollinators, and food security. *Environments*, 6(2), 22.

498 Martinelli, L. A., Batistella, M., Silva, R. F. B. D., Moran, E. (2017). Soy expansion and
 499 socioeconomic development in municipalities of Brazil. *Land*, 6(3), 62.

500 Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis,
 501 J.S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries:
 502 Implications for honey bee health. *PloS One* 5, e9754.
 503 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>

504 Nagy, K., Duca, R. C., Lovas, S., Creta, M., Scheepers, P. T., Godderis, L., Ádám, B. (2020).
 505 Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active
 506 ingredients and their product formulations. *Environmental research*, 181, 108926.

507 Nogueira Neto, P. (1953). Criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae).

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

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

516 Oliveira, R.C., Queiroz, S.C.N, Luz, C.F.P., Porto, R.S., Rath, S. (2016). Bee pollen as a
517 bioindicator of environmental pesticide contamination. Chemosphere 163, 525-534.
518 <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.022>

519 Pedro, S. R. (2014). The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). Sociobiology,
520 61(4), 348-354.

521 Pereira, J. L., Antunes, S. C., Castro, B. B., Marques, C. R., Gonçalves, A. M., Gonçalves,
522 F., Pereira, R. (2009). Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and
523 soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. Ecotoxicology, 18(4),
524 455-463.

525 Pires, C. S. S., Maués, M. M. (2020). Insect Pollinators, Major Threats and Mitigation
526 Measures.

527 Pires, C. S. S., Pereira, F. D. M., Lopes, M. T. D. R., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Pettis,
528 J. S., Teixeira, É. W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil:
529 há casos de CCD?. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 51(5), 422-442.

530 Pires, C. S. S., Torezani, K. D. S., Cham, K. O., Viana-Silva, F. E. C., Borges, L. O., Tonelli,
531 C. A. M., Cione, A. P. (2018). Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de
532 risco de agrotóxicos. Brasília: Ibama.

533 Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W. E.
534 (2010). Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends in ecology &
535 evolution, 25(6), 345-353.

536 Qi, S., Niu, X., Wang, D.H., Wang, C., Zhu, L., Xue, X., Zhang, Z., Wu, L. (2020).
537 Flumethrin at sublethal concentrations induces stresses in adult honey bees (*Apis*
538 *mellifera* L.). Sci. Total Environ. 700, 134500.
539 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134500>.

540 Ramírez, V. M., Ayala, R., González, H. D. (2018). Crop pollination by stingless bees. In
541 Pot-pollen in stingless bee melittology (pp. 139-153). Springer, Cham.

542 Rinkevich, F. D., Margotta, J. W., Pittman, J. M., Danka, R. G., Tarver, M. R., Ottea, J. A.,
543 Healy, K. B. (2015). Genetics, synergists, and age affect insecticide sensitivity of the
544 honey bee, *Apis mellifera*. PLoS One, 10(10), e0139841.

545 Roat, T. C., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C., Silva-Zacarin, E. C., Palma, M. S., Malaspina,
546 O. (2013). Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of
547 Africanized honeybees. Archives of environmental contamination and toxicology,
548 64(3), 456-466.

549 Ruttner, F. (2013). Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer Science & Business
550 Media.

551 Sánchez-Bayo, F. Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna: A
 552 review of its drivers. *Biol. Conserv.* 232, 8–27.
 553 <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>.

554 Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M.,
 555 Downs, C., Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil):
 556 trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution*
 557 *Research*, 22(1), 5-34.

558 St. Clair, A. L., Zhang, G., Dolezal, A. G., O’Neal, M. E., Toth, A. L. (2020). Diversified
 559 farming in a monoculture landscape: Effects on honey bee health and wild bee
 560 communities. *Environmental entomology*, 49(3), 753-764.

561 USDA (2021). Oilseeds: World Markets and Trade. United States Department of
 562 Agriculture. Foreign Agricultural Service [online]
 563 [https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-](https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tx31qh68h/hq37wg66q/q237jm44p/oilseeds.pdf)
 564 [esmis/files/tx31qh68h/hq37wg66q/q237jm44p/oilseeds.pdf](https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tx31qh68h/hq37wg66q/q237jm44p/oilseeds.pdf) (acesso em 08 abr. 2021)

565 Venturieri, G.C., Alves D.A., Villas-Bôas J.K., Carvalho C.A., Menezes C., Neto A.V.
 566 (2011). Meliponicultura no Brasil: Situação atual e perspectivas futuras para o uso na
 567 polinização, In: Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Saraiva AM, Polinizadores no
 568 Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação
 569 e serviços ambientais. São Paulo: EDUSP; 2011. pp. 227-255

570 Watanabe, M. E. (2014). Pollinators at Risk: Human activities threaten key species.
 571 *BioScience*, 64(1), 5-10.