

Revista
Ciência, Tecnologia & Ambiente

Efeitos do imidacloprido sobre o comportamento das abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae)

Mariana Barrotti da Silva¹, Roberta Cornélio Ferreira Nocelli^{2*}, Hellen Maria Soares³, Osmar Malaspina³

¹ Licenciatura em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP

² Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP

³ Centro de Estudos em Insetos Sociais, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP

*roberta@cca.ufscar.br

RESUMO

O imidacloprido é um neonicotinóide de ação sistêmica, agonista da acetilcolina. Em concentrações subletais, o inseticida pode afetar o forrageamento, a aprendizagem olfatória e a atividade motora das abelhas, sendo raros trabalhos do tipo com espécies nativas brasileiras, importantes na polinização de plantas silvestres e cultivadas. Para avaliar os efeitos dos inseticidas sobre o comportamento das abelhas tem sido utilizado os bioensaios de reflexo de extensão da probóscide (REP) e avaliação da atividade locomotora. Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar os impactos de concentrações subletais de imidacloprido sobre o comportamento da espécie nativa *Scaptotrigona postica*. Os resultados mostraram diferenças significativas nas respostas de REP das abelhas expostas às concentrações 0,42; 0,85 e 4,25 ng/μL em relação ao controle, para todas as concentrações de sacarose oferecidas. No teste da atividade locomotora, as velocidades médias das abelhas expostas às concentrações de 4,25 e 21,25 ng/μL foram significativamente menores do que os controles. O imidacloprido interferiu no comportamento da abelha *S. postica*, podendo dessa forma afetar o reconhecimento de fontes de alimento e a viabilidade da locomoção dessas abelhas em campo. A longo prazo, essa alteração pode comprometer o funcionamento da colônia, contribuindo para o seu declínio.

Palavras-chave: abelhas sem ferrão, reflexo de extensão da probóscide, atividade locomotora, neonicotinóide.

ABSTRACT

Imidacloprid is a systemic neonicotinoid who act as of acetylcholine agonist. In sublethal concentrations, the insecticide may affect foraging, the olfactory learning and motor activity of bees, and are rare researches of the type with Brazilian native species, so important in the pollination of wild and cultivated plants. To assess the effects of pesticides on bee behavior has been used the bioassays of proboscis extension reflex (PER) and evaluation of locomotor activity. The objectives of this study were to evaluate the effects of sublethal concentrations of imidacloprid on the behavior of native species *Scaptotrigona postica*. The results showed significant differences in the PER responses of bees exposed to the concentrations 0.42; 0.85 and 4.25 ng / uL compared to control for all sucrose concentrations offered. In testing locomotor activity, the mean velocities of bees exposed to concentrations of 4.25 and 21.25 ng / were significantly lower than controls. The imidacloprid interfered with the behavior of the bee *S. postica* and can thus affect the recognition of food sources and the feasibility of locomotion of these bees in the field. In the long run, this change may jeopardize the functioning of the colony, contributing to its decline.

Keywords: stingless bees, extension of the proboscis reflex, locomotor activity, neonicotinoid.

INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão são essenciais para a manutenção da vegetação brasileira e de diferentes culturas agrícolas (Macieira and Proni, 2004, Kerr et al., 2010). Quando forrageiam em ambientes cultivados, são expostas a diversas substâncias potencialmente tóxicas utilizadas para o controle de pragas, como herbicidas, fungicidas e inseticidas (Bayo and Goka, 2016).

O imidacloprido é um inseticida neonicotinóide, amplamente utilizado nas culturas, que atua como agonista da acetilcolina. Ao se ligar aos receptores nicotínicos de acetilcolina, este inseticida não é degradado pela acetilcolinesterase, causando hiperexcitabilidade e morte do inseto (Casida and Durkin, 2013). Estudos verificaram que os neonicotinóides, em doses e concentrações subletais, podem não provocar a morte imediata das abelhas, mas levar a alterações comportamentais que comprometem o funcionamento da colônia (Lambin et al., 2001, El Hassani et al., 2008, Teeters et al., 2012). Além de intoxicar as abelhas forrageiras que estão no campo, inseticidas sistêmicos, como o imidacloprido, foram detectados no pólen e néctar, o que indica que todos os indivíduos da colônia estão expostos a estes agrotóxicos (Wu et al., 2011).

Para a avaliação dos efeitos dos agrotóxicos para abelhas, vários estudos foram desenvolvidos com o intuito de reproduzir em laboratório situações comportamentais de campo. Um método que analisa os efeitos dos inseticidas sobre o comportamento das abelhas é o reflexo de extensão da probóscide (REP), no qual a abelha estende sua probóscide como reflexo a um estímulo não condicionado que os receptores do tarso, das antenas ou das peças bucais recebem de uma fonte odorífera (Bitterman et al., 1983, Sandoz et al., 1995). O teste reproduz a interação abelha-flor: ao pousar na flor, a abelha estende sua probóscide como reflexo ao estímulo que seus receptores gustatórios recebem do néctar floral. Este processo induz a abelha memorizar o odor floral e associá-lo a uma recompensa alimentar, permitindo o reconhecimento das próximas nas próximas visitas e a realização do forrageamento eficaz (Menzel et al., 1993). Em doses subletais, o imidacloprido pode afetar a aprendizagem

e memória das abelhas, prejudica as respostas para o REP e diminui o retorno desses indivíduos à colônia (Bortolotti et al., 2003, Decourtye et al. 2004a, 2004b)

Outra avaliação que verifica os efeitos dos inseticidas sobre o comportamento das abelhas é a análise da atividade locomotora. Autores tem utilizado a habilidade destes insetos de se orientarem à uma fonte luminosa, para avaliar os efeitos dos inseticidas sobre a locomoção e também para examinar o tempo que as abelhas levam para se deslocar em um determinado percurso (Lambin et al., 2001, El Hassani et al., 2008, Aliouane et al., 2009). A locomoção das abelhas pode ser comprometida por inseticidas como o tiametoxam, acetamiprido e imidacloprido, uma vez que, essas substâncias diminuam o deslocamento e provocam paralisias nestes insetos (Aliouane et al., 2009, Teeters et al., 2012).

Segundo Lima e colaboradores (2016), estudos toxicológicos com espécies sem ferrão de abelhas são raros e os poucos existentes limitam-se à análises histopatológicas, sendo necessário maiores verificações sobre os impactos dos inseticidas na fisiologia e na dinâmica dessas abelhas. Visto que as abelhas sem ferrão são extremamente importantes para a manutenção da biodiversidade dos ecossistemas tropicais e para a produção agrícola, este estudo avaliou os efeitos do imidacloprido sobre o comportamento da abelha *Scaptotrigona postica*, através dos testes de reflexo de extensão da probóscide (REP) e atividade locomotora.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das abelhas sem ferrão

Abelhas operárias campeiras de *S. postica* foram coletadas no meliponário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Rio Claro, São Paulo, Brasil. Foram utilizadas 3 colônias diferentes, sendo 20 indivíduos de cada. Após as coletas, as abelhas foram acondicionadas em recipientes plásticos com suprimento de alimento (mistura de açúcar invertido e água destilada 1:1 v/v) e mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD), a $28 \pm 1^\circ\text{C}$

e umidade relativa de 70%, simulando as condições naturais da colônia. Os testes contaram com dois grupos controle, nos quais um deles recebeu apenas o alimento descrito (0) e o outro teve a adição de acetona ao alimento, na mesma proporção da maior concentração de inseticida utilizada (OS), para garantir que a mesma não exerce nenhum efeito sobre as abelhas.

Exposição oral ao inseticida imidacloprido

Uma solução estoque de imidacloprido (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foi preparada a 1000 ng/ μ L em 20% acetona. A partir desta solução estoque, sucessivas diluições foram feitas no alimento para a obtenção das concentrações a serem oferecidas às abelhas (42,5; 21,25; 4,25; 0,85 e 0,42). As concentrações escolhidas basearam-se na concentração média letal (CL_{50}) de 42,5 ng de imidacloprido/ μ L de dieta em 24 horas (Soares et al., 2015). O alimento contaminado com o inseticida foi oferecido *ad libitum*, por 24 horas. Após as exposições ao inseticida, parte das abelhas passou pela avaliação de reflexo de extensão da probóscide (10 abelhas de cada uma das 3 colônias para cada grupo experimental) e outra parte foi submetida ao teste da atividade locomotora (10 abelhas de cada uma das 3 colônias para cada grupo experimental). O controle passou pelos mesmos procedimentos dos grupos que foram expostos ao imidacloprido, porém, receberam o alimento sem contaminação. Os experimentos de reflexo de extensão da probóscide e locomoção foram realizados em triplicata, totalizando 90 abelhas de cada grupo experimental para cada um dos experimentos.

Avaliação do Reflexo de Extensão da Probóscide (REP)

Após a exposição ao inseticida, as abelhas foram mantidas 1h30 em jejum, anestesiadas sob refrigeração por 20 segundos e inseridas, individualmente, em tubos plásticos furados na parte inferior. O ensaio contou com uma oferta inicial de água, com o auxílio de uma haste flexível, seguida pelo oferecimento de 1%, 10%, 30%, 55% e 75% de solução de sacarose. Essas soluções foram

aproximadas das antenas das abelhas durante 10 segundos e considerou-se resposta positiva quando houve completa extensão de probóscide. Os indivíduos que não responderam a concentrações consecutivas ou responderam na primeira apresentação de água foram desconsiderados da avaliação e também da quantificação das respostas dos demais insetos analisados.

Avaliação da atividade locomotora

A análise foi baseada no método de Lambin (2001) para *A. mellifera*. Durante o teste, foram gravados os deslocamentos das abelhas com uma câmera, Fujifilm Finepix S4000, (Fuji S-4000, 14 megapixels, zoom de 30 vezes). O ensaio foi desenvolvido numa caixa de madeira de 80 x 30 x 4 cm de tamanho, com seis divisões internas formando raias de 50 cm de medida. A caixa possui uma placa de vidro na superfície superior e, nessa mesma superfície, há uma lâmpada fluorescente para estimular as abelhas a caminharem na sua direção, já que estes insetos são fototáticos positivos (Lambin et al., 2001, El Hassani et al., 2005). Na marcação dos 50 cm havia uma tela de nylon para impedir a chegada das abelhas até a lâmpada e, na superfície inferior da caixa, havia seis entradas individuais para cada uma das raias, por onde os indivíduos avaliados foram introduzidos para o teste. Foi quantificado, através do temporizador da câmera, o tempo que cada abelha levou para se deslocar no trajeto demarcado de 50 cm na raia.

Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram avaliados pelos programas BioEstat 5.0 e Sigma Plot 11.0, sendo utilizado para a avaliação de REP o teste de Qui-Quadrado ($p < 0,0001$) e para a atividade locomotora o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,0001$), Dunn ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Reflexo de Extensão da Probóscide

Ao se comparar estatisticamente a diferença das respostas positivas e negativas de REP entre o controle e o controle com acetona, não houve diferença sugerindo que o solvente utilizado para a solubilização do imidacloprido

não interferiu no reconhecimento da sacarose pelas abelhas (Tabela 1).

O Reflexo de Extensão da Probóscide de operárias campeiras de *S. postica* foi significativamente afetado pela presença de imidacloprido (REP à 1% de sacarose- $X^2=43.6794$, G.L.=6, $p<0,0001$; REP à 10% de sacarose- $X^2=133.1520$, G.L.=6, $p<0,0001$; REP à 30% de sacarose- $X^2=214.3638$, G.L.=6, $p<0,0001$; REP à 55% de sacarose- $X^2=252.5388$, G.L.=6, $p<0,0001$; REP à 75% de sacarose- $X^2=260.8142$, G.L.=6, $p<0,0001$).

Observou-se que a 1% de sacarose houve diferença significativa apenas entre as abelhas do grupo controle acetona e a concentração de 4,25 ng/ μ L ($p<0,0001$) (Tabela 1).

As respostas positivas e negativas das abelhas expostas às concentrações 0,42; 0,85; 4,25 e 21,25 ng/ μ L

foram significativas em relação as respostas positivas e negativas do controle e do controle acetona para as concentrações de sacarose acima de 10% ($p<0,0001$) (Tabela 1). Devido a alta taxa de mortalidade das abelhas expostas as maiores concentrações de inseticida, principalmente a de 42,5 ng/ μ L, o número amostral para as análises estatísticas de REP ficaram reduzidos e, dessa forma, as respostas positivas e negativas desta concentração foram significativas apenas comparando-se com os seguintes grupos: Controle acetona 30, 55 e 75% de sacarose e controle 55 e 75% ($p<0,0001$) (Tabela 1).

Entre os grupos expostos às concentrações do imidacloprido não houve diferenças significativas, exceto entre 0,42 ng/ μ L e 4,25 ng/ μ L nas respostas para 55 ($p<0,0001$) e 75% ($p<0,0001$) de sacarose (Tabela 1).

Tabela 1. Respostas de extensão da probóscide das abelhas *S. postica*, 24 horas após exposição oral ao imidacloprido (ng/ μ L).

| Sacarose | Respostas | 0 | 0S | 0,42 | 0,85 | 4,25 | 21,25 | 42,5 |
|----------|------------------|---------------|------------|------------|-------------|------------|-------------|---------------|
| 1% | Positivas | 13 | 17 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | Negativas | 76 | 73 | 84 | 83 | 87 | 50 | 11 |
| | Diferença | AB | A | AB | AB | B | AB | AB |
| 10% | Positivas | 33 | 43 | 6 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | Negativas | 56 | 47 | 82 | 81 | 87 | 50 | 11 |
| | Diferença | A' | A' | B' | B' | B' | B' | A'B' |
| 30% | Positivas | 55 | 63 | 12 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| | Negativas | 34 | 27 | 76 | 77 | 87 | 50 | 11 |
| | Diferença | A''C'' | A'' | B'' | B'' | B'' | B'' | B''C'' |
| 55% | Positivas | 67 | 72 | 16 | 13 | 0 | 0 | 0 |
| | Negativas | 22 | 18 | 72 | 71 | 87 | 50 | 11 |
| | Diferença | a | a | b | bc | c | bc | bc |
| 75% | Positivas | 70 | 72 | 19 | 11 | 0 | 0 | 0 |
| | Negativas | 19 | 18 | 69 | 73 | 87 | 50 | 11 |
| | Diferença | a' | a' | b' | b'c' | c' | b'c' | b'c' |

Letras diferentes indicam significância de $p<0,0001$ (Qui-quadrado) entre as repostas dos grupos experimentais.

Atividade Locomotora

Os resultados mostraram que a exposição ao imidacloprido afeta a atividade locomotora das abelhas sem ferrão ($H=172.665$, G.L.=6, $p<0,0001$).

As velocidades médias (centímetros/segundos) de todos os grupos expostos ao inseticida, com exceção de 0,42 ng/ μ L, foram significativamente menores do que o controle e o controle acetona ($p<0,05$) (Figura 2).

A concentração de 0,42 ng/ μ L teve sua velocidade média significativamente maior do que

as demais concentrações avaliadas ($p<0,05$) (Figura 2). A velocidade média do grupo 21,25 ng/ μ L foi significativamente menor do que as velocidades dos grupos 0,85 e 4,25 ng/ μ L ($p<0,05$) (Figura 2).

Devido a alta mortalidade das abelhas das maiores concentrações, a locomoção de apenas 7 abelhas pode ser avaliada para 42,5 ng/ μ L e 25 abelhas para 21,25 ng/ μ L, enquanto que nos demais grupos experimentais foram analisadas 85 abelhas.

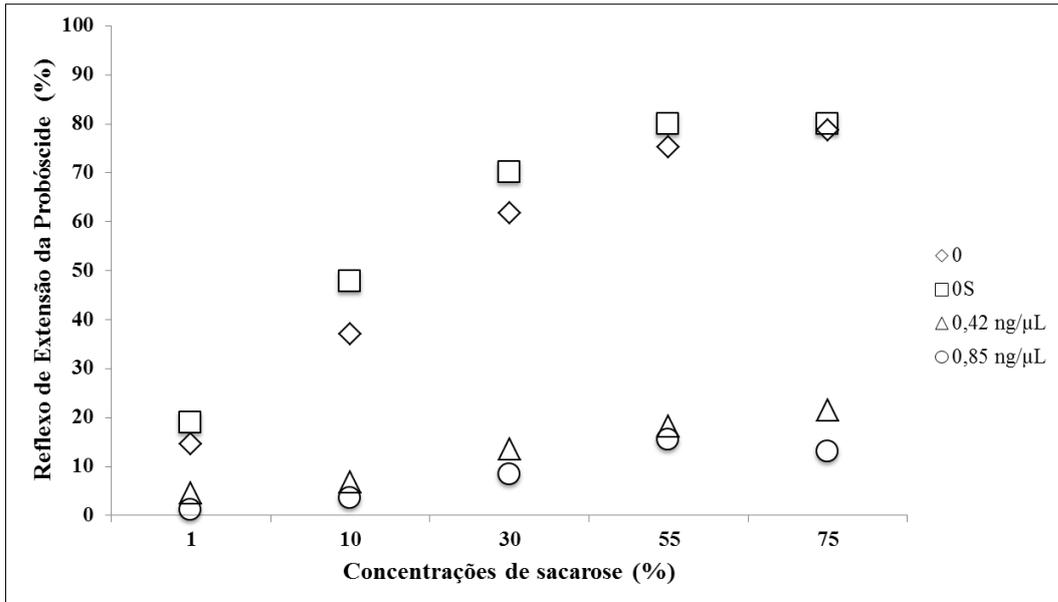


Figura 1. Porcentagem de abelhas *S. postica* que responderam ao reflexo de extensão da probóscide, 24 horas após exposição oral ao inseticida imidacloprido. 0: Controle, OS: Controle Solvente. As concentrações de 4,25; 21,25 e 42,50 ng/µL não estão representadas no gráfico por não apresentarem REP positivas.

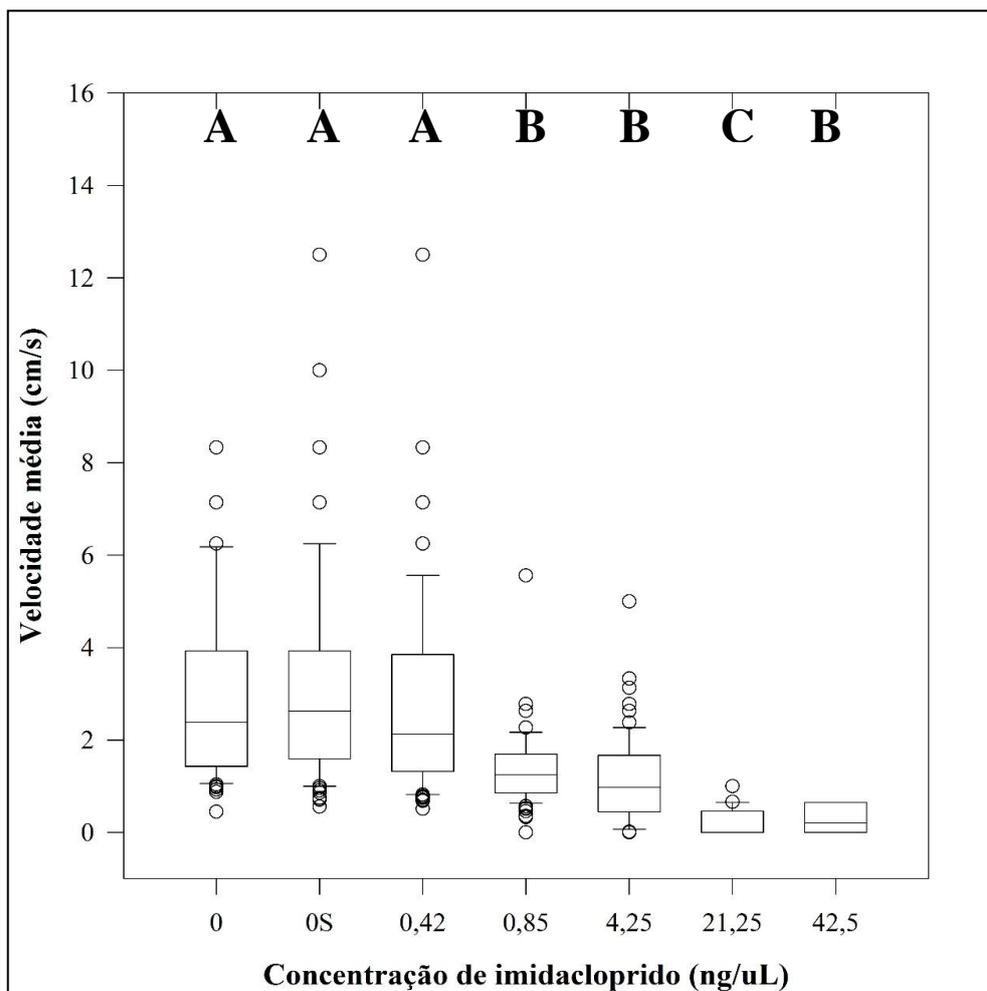


Figura 2. Atividade locomotora das abelhas *S. postica* após 24 horas de exposição oral ao inseticida imidacloprido. As letras representam os resultados estatísticos da comparação das velocidades entre os diferentes grupos experimentais, sendo que letras diferentes indicam significância $p < 0,05$ (Kruskall-Wallis, Dunn).

DISCUSSÃO

As respostas de REP sugerem um efeito deletério do imidacloprido sobre os comportamentos de reconhecimento e coleta de uma fonte de açúcar, mostrando que o inseticida prejudica as funções sensoriais de operárias campeiras de *S. postica*.

Estes resultados corroboram dados de outros estudos que mostram que o imidacloprido pode diminuir a capacidade de reconhecimento de potenciais fontes de alimento, comprometer a aprendizagem, memória e o retorno à colônia, em abelhas da espécie *A. mellifera* (Bortolotti et al., 2003, Decourtye et al., 2004a, Decourtye et al., 2004b, Han et al., 2010, Carrillo et al., 2013).

Em estudo semelhante, Lambin et al. (2001) observaram que o imidacloprido, nas doses de 1,25 e 2,50 ng/abelha, não interfere nas respostas ao REP de abelhas recém-emergidas de *A. mellifera*, enquanto que para as concentrações de 5, 10 e 20 ng/abelha pode levar a perda da sensibilidade gustativa das abelhas. Os dados do presente estudo mostraram que, a partir da exposição às menores concentrações de imidacloprido, 0,42 e 0,85 ng/ μ L, houve diminuição da resposta ao REP para todas as soluções de sacarose oferecidas, enquanto que a partir de 4,25 ng/ μ L as respostas se anularam. Estes resultados sugerem uma maior suscetibilidade das abelhas *S. postica* em comparação a espécie *A. mellifera*, já que a partir da oferta de 0,42 ng/ μ L as abelhas apresentaram decréscimo das respostas REP.

Del Sarto (2014) também constataram uma maior sensibilidade de *M. quadrafasciata* quando exposta via oral a inseticidas não neonicotinoides como a deltametrina e o metamidofós do que *A. mellifera*, sugerindo-se dessa forma, uma maior vulnerabilidade das abelhas sem ferrão aos agrotóxicos.

Os resultados deste estudo apontam também, um decréscimo da velocidade das abelhas *S. postica* após a exposição ao imidacloprido, representado por uma diminuição da mobilidade desses indivíduos, podendo comprometer as atividades realizadas por estes insetos. Em seus estudos com *A. mellifera*, Lambin et al. (2001) observaram um aumento na atividade motora em

abelhas submetidas ao imidacloprido nas doses de 1,25 ng/abelha, independente do tempo de exposição. Nas abelhas expostas a 2,5 ng/abelha de imidacloprido verificou aumento da locomoção, 15 minutos após os testes. Entretanto, 30 minutos após a exposição a 5 e 20 ng/abelha e 60 minutos com 2,5 e 20 ng/abelha, o inseticida diminuiu o deslocamento das abelhas. Em contrapartida, verificamos neste estudo, que as concentrações de imidacloprido testadas não provocaram aumento da mobilidade das abelhas, constatando-se apenas que as velocidades das abelhas expostas as concentrações de 4,25 e 21,25 ng/ μ L foram significativamente menores do que a dos controles e a de 0,42 ng/ μ L.

Em trabalho realizado com outra espécie de abelha sem ferrão, Tomé et al. (2012) verificaram que recém-emergidas de *M. quadrafasciata anthidioides* expostas ao imidacloprido não tiveram sua mobilidade comprometida, enquanto que os indivíduos de 4 a 8 dias de idade tiveram sua locomoção afetada. Os autores observaram que, conforme as concentrações de imidacloprido e a idade das abelhas aumentavam, havia um decréscimo do deslocamento e da velocidade desses indivíduos. O imidacloprido provocou também, um aumento da quantidade de abelhas paradas no trajeto de deslocamento e do tempo que elas permaneciam paradas no teste. Similar ao constatado neste trabalho, verificou-se que 1,12; 6,74; 55 e 42,86% das abelhas *S. postica* expostas à 0,85; 4,25; 21,25 e 42,5 ng/ μ L, respectivamente, permaneceram paralisadas ao longo do teste e 11,24; 30 e 42,86% dos indivíduos expostos a 4,25; 21,25 e 42,5 ng/ μ L não completaram o percurso durante as análises.

Os resultados gerais podem ser relacionados ao mecanismo de ação do imidacloprido. Os receptores nicotínicos de acetilcolina, aos quais o agrotóxico se liga irreversivelmente, localizam-se no cérebro dos insetos em regiões associadas ao processamento das informações olfatórias, mecanossensoriais, aprendizado e memória (Gauthier, 2010). O imidacloprido age agonisticamente, ou seja, ao se ligar aos receptores de acetilcolina, o inseticida promove passagem contínua do impulso nervoso e,

modifica, assim, a fisiologia do sistema nervoso do inseto, podendo comprometer a memória olfatória e as funções motoras das abelhas (Lambin et al., 2001; Decourtye et al., 2004b).

Os danos provocados pelo imidacloprido na REP e no deslocamento das abelhas podem afetar as atividades realizadas por esses indivíduos impactando na sobrevivência desses, na viabilidade da colônia, na polinização eficaz da mata nativa, bem como na produção de alimentos.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o imidacloprido afeta negativamente as abelhas, seja na capacidade de reconhecimento de uma fonte de alimento, seja na capacidade de deslocamento e orientação. Este trabalho contribuiu com o desenvolvimento de medidas mais protetivas visando à conservação das abelhas brasileiras e dá subsídios para o desenvolvimento de estudos comportamentais que utilizem outras abelhas além do modelo *A. mellifera*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento dado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo / FAPESP, Brasil (2012/50197-2) para o desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS

ALIOUANE, Y., EL HASSANI, A.K., GARY, V., ARMENGAUD, C., LAMBIN, M. and GAUTHIER, M., 2009. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Pensacola, vol. 28, no. 1, pp. 113-122.

BAYO-SANCHEZ, F. and GOKA, K., 2016. Impacts of Pesticides on Honey Bees. In: E. D. CHAMBÓ. *Beekeeping and Bee Conservation - Advances in Research*. Rijeka: INTECH, pp. 77-97.

BITTERMAN, M. E., MENZEL, R., FIETZ, A. and SCHÄFER, S., 1983. Classical-conditioning of

proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, Washington, vol. 97, no. 2, pp. 107-119.

BORTOLOTTI, L., MONTANARI, R., MARCELINO, J., MEDRZYCKI, P., MAINI, S., and PORRINI, C., 2003. Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. *Bulletin of Insectology*, vol. 56, pp. 63-68.

CARRILLO, M. P., BOVI, T.D.S., NEGRÃO, A.F. and ORSI, R.D.O., 2013. Influence of agrochemicals fipronil and imidacloprid on the learning behavior of *Apis mellifera* L. honeybees. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, vol. 35, no. 4, pp. 431-434.

CASIDA, J. E. and DURKIN, K. A., 2013. Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects. *Annual Review of Entomology*, vol. 58, pp. 99-117.

CRESSWELL, J. E., PAGE, C.J., UYGUN, M.B., HOLMBERG, M., LY, Y. and WHEELER, J.G., 2012. Differential sensitivity of honeybees and bumblebees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology*, vol. 115, no. 6, pp. 365-371.

DECOURTYE, A., DEVILLERS, J., CLUSEAU, S., CHARRETON, M. and PAM-DELEGUE, M.H., 2004a. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 57, no. 3, pp. 410-419.

DECOURTYE, A., ARMENGAUD, C., RENOU, M., DEVILLERS, J., CLUSEAU, S., GAUTHIER, M. and PHAM-DELEGUE, M. H., 2004b. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide of Biochemistry Physiology*, San Diego, vol. 78, pp. 83-92.

DEL SARTO, M. C. L., OLIVEIRA, E. E., GUEDES, R. N. C. and CAMPOS, L.A.O., 2014. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*, vol.45, no.1, pp. 626-636.

EL HASSANI, A. K., DACHER, M., GAUTHIER, M. and ARMENGAUD, C., 2005. Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the

- honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, vol. 82, no. 1, pp. 30-39.
- EL HASSANI, A. K., DACHER, M., GARY, M., LAMBIN, M., GAUTHIER, M. and ARMENGAUD, C., 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 54, no. 4, pp. 653-661.
- FELTHAM, H.; PARK, K. and GOULSON, D., 2014. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology*, vol. 23, no. 3, pp. 317-323.
- GUEZ, D.; SUCHAIL, S.; GAUTHIER, M.; MALESZKA, R. and BELZUNCES, L.P., 2001. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8- day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory*, vol. 76, pp. 183-191.
- GUEZ, D.; BELZUNCES, L.P. and MALESZKA, R., 2003. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, vol. 75, pp. 217-222.
- HAN, P., NIU, C.Y., LEI, C.L., CUI, J.J. and DESNEUX, N., 2010. Use of an innovative T-tube maze assay and the proboscis extension response assay to assess sublethal effects of GM products and pesticides on learning capacity of the honey bee *Apis mellifera* L. *Ecotoxicology*, vol. 19, no. 8, pp. 1612-1619.
- KERR, W. E., CARVALHO, G.A., SILVA, A.C. and ASSIS, M.G.P., 2010. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias estratégicas*, no.12, pp. 20 - 41.
- LAMBIN, M.; ARMENGAUD, C.; RAYMOND, S. and GAUTHIER, M., 2001. Imidacloprid- Induced Facilitation of the Proboscis Extension Reflex Habituation in the Honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, vol. 48, pp.129-134.
- LIMA, M. A. P., MARTINS, G. F., OLIVEIRA, E. E. and GUEDES, R. N.C., 2016. Agrochemical induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *Journal of Comparative Physiology A*, vol. 202, pp. 1-15.
- MENZEL, R., GREGGERS, U. and HAMMER, M., 1993. Functional organization of appetitive learning and memory in a generalist pollinator, the honey bee. In: D.R. PAPAJ and A. C. LEWIS, Eds. *Insect learning*. New York: Chapman Hall. pp. 79-125.
- MOMMAERTS, V., REYNDERS, S., BOULET, J., BESARD, L., STERK, G. and SMMAGHE, G., 2010. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. *Ecotoxicology*, vol. 19, no. 1, pp. 207-215.
- MORAES, S. S., BAUTISTA, A. R. L. and VIANA, B. F., 2000. Avaliação da Toxicidade Aguda (DL₅₀ e CL₅₀) de inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de Contato. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, vol. 29, no.1, pp.31-37.
- SANDOZ, J. C., ROGER, B. and PHAM-DELÈGUE, M. H., 1995. Olfactory learning and memory in the honeybee - comparison of different classical-conditioning procedures of the proboscis extension response. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences*, Paris, vol. 318, no. 7, pp. 749-755.
- TEETERS, B. S., JOHNSON, R.M., ELLIS, M.D. and SIEGRIFID, B.D., 2012. Using video-tracking to assess sublethal effects of pesticides on honey bees (*Apis mellifera* L.). *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 31, no. 6, pp. 1349-1354.
- TOMÉ, H. V. V., MARTINS, G.F., LIMA, M.A.P., CAMPOS, L.A.O. and GUEDES, R. N.C., 2012. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PloS ONE*, vol. 7, no. 6, p. e38406.
- WILLIAMSON, S. M.; WILLIS, S. J. and WRIGHT, G. A., 2014. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology*, vol. 23, no. 8, pp. 1409-1418, 2014.