

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

Jocélia Gonçalves da Silva

RELAÇÕES TRÓFICAS E RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM
***BOMBUS* SPP. (HYMENOPTERA: APIDAE) NO RIO GRANDE DO**
SUL

Santa Maria – RS, Brasil
2020

Jocélia Gonçalves da Silva

**RELAÇÕES TRÓFICAS E RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM *BOMBUS* SPP.
(HYMENOPTERA: APIDAE) NO RIO GRANDE DO SUL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Agronomia.**

Orientador: Prof. Dr. Jerson V. Carús Guedes

Santa Maria – RS, Brasil
2020

Silva, Jocélia
RELAÇÕES TRÓFICAS E RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM BOMBUS
SPP. (HYMENOPTERA: APIDAE) NO RIO GRANDE DO SUL /
Jocélia Silva.- 2020.
100 p.; 30 cm

Orientador: Jerson Guedes
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2020

1. Bombus 2. Distribuição 3. Flora associada 4. Pólen
5. Agrotóxicos I. Guedes, Jerson II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2020

Todos os direitos autorais reservados a **Jocélia Gonçalves da Silva**. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: joceliags@hotmail.com

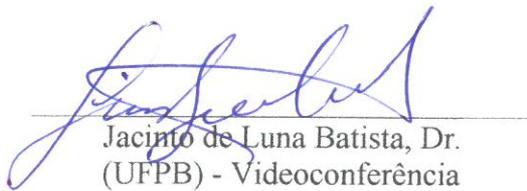
Jocélia Gonçalves da Silva

**RELAÇÕES TRÓFICAS E RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM *BOMBUS* SPP.
(HYMENOPTERA: APIDAE) NO RIO GRANDE DO SUL**

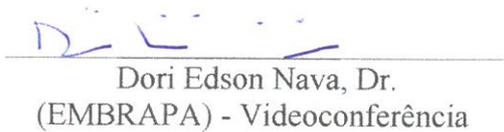
Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Agronomia**.

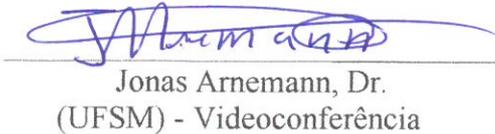
Aprovada em 27 de novembro de 2020:


Jerson V. Carús Guedes, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Jacinto de Luna Batista, Dr.
(UFPB) - Videoconferência


Soraia Girardi Bauermann, Dra.
(ULBRA) - Videoconferência


Dori Edson Nava, Dr.
(EMBRAPA) - Videoconferência


Jonas Arnemann, Dr.
(UFSM) - Videoconferência

Santa Maria – RS, Brasil
2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho de tese aos meus pais José Alves (in memoriam) e Célia, e aos meus irmãos Jocelmo, Joálisson e Joéliton. Todo meu amor e gratidão a vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus e a minha família, em nome do meu pai José Alves (*in memoriam*), minha mãe Célia e meus irmãos Jocelmo, Joálisson e Joéliton, por serem minha base e fortaleza. Agradeço a minha família por todo apoio e incentivo à minha educação. Agradeço-lhes ainda pelo carinho e orações que fortaleceram minha caminhada. Meu amor e eterna gratidão a vocês.

Quero agradecer ao professor orientador Dr. Jerson Vanderlei Carús Guedes, que me recebeu em seu grupo de pesquisa, LabMIP, dando-me a oportunidade de me tornar uma profissional mais qualificada. Obrigada por ter acreditado em mim, por ter me mostrado caminhos para meu desenvolvimento profissional, e por todo incentivo.

Agradeço ao professor Dr. Jacinto de Luna Batista (UFPB), meu orientador da graduação, co-orientador do mestrado e agora, membro da minha banca de tese do doutorado, por todos os ensinamentos transmitidos e por está sempre disposto a contribuir com minha formação profissional.

Agradeço aos professores Dra. Cláudia Inês da Silva (USP), Dra. Soraia Girardi Bauermann (ULBRA) e Dr. Renato Zanella (UFSM), por terem aberto as portas dos seus laboratórios e contribuído para o desenvolvimento das pesquisas da minha tese.

Agradeço a Professora Dra. Betina Blochtein, curadora da Coleção de Abelhas do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCT), por permitir a visita à coleção de *Bombus* spp. e por ceder informações sobre os registros de *Bombus* no Rio Grande do Sul.

Agradeço a empresa Koppert Biological Systems, na pessoa de Ana Lia Parra Pedrazzoli, pela parceria na condução da primeira etapa da pesquisa e por todos conhecimentos repassados sobre as abelhas do gênero *Bombus*.

Também gostaria de agradecer a todos os meus colegas com quem trabalhei no laboratório do LabMIP-UFSM e que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização da minha pesquisa. Agradeço em especial a Manoela Beche e Joálisson Gonçalves da Silva (meu irmão e companheiro de profissão) que estiveram comigo em diversas viagens para coleta de material para minha pesquisa e me auxiliaram em tudo que estiveram ao seu alcance.

Finalmente, gostaria de agradecer aos membros da minha banca de avaliação da tese, Dr. Jacinto de Luna Batista, Dra. Soraia Girardi Bauermann, Dr. Dori Edson Nava e Dr. Jonas Arnemann, pelo aceite em fazer parte do meu comitê e pelas orientações dadas.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

Simone de Beauvoir

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo.

Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

RELAÇÕES TRÓFICAS E RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM *BOMBUS* SPP. (HYMENOPTERA: APIDAE) NO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: Jocélia Gonçalves da Silva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jerson Vanderlei Carús Guedes

Cerca de 70% das plantas cultivadas, que são utilizadas diretamente para o consumo humano, têm aumento de produção em consequência da polinização promovida por animais, principalmente abelhas. Das 141 espécies de plantas cultivadas no Brasil – para uso na alimentação humana, produção animal, biodiesel e fibras – aproximadamente 60% (85 espécies) dependem em certo grau da polinização animal. Os serviços de polinização nas áreas agrícolas dependem tanto das espécies domesticadas quanto das populações de abelhas silvestres. Dentre os polinizadores, é possível destacar as abelhas do gênero *Bombus*, conhecidas popularmente como mamangavas de chão, e que são importantes polinizadores em áreas nativas e cultivadas, dependendo do pólen e do néctar de uma grande variedade de plantas. As observações de visitação e comportamento alimentar dos polinizadores em campo é importante para estabelecer a relação entre as espécies de *Bombus* e as plantas por elas exploradas. No Rio Grande do Sul já foram descritas as espécies *Bombus morio* Swederus, *B. pauloensis* Friese, *B. bellicosus* Smith e *B. brasiliensis* Lepeletier, no entanto nos últimos anos, *B. brasiliensis* não tem sido mais encontrada. Pesquisas apontam e comprovam o declínio populacional dessas abelhas em vários países do mundo, principalmente como consequência da intensificação da agropecuária. A pesquisa foi desenvolvida, abordando os aspectos acima explanados (abelhas do gênero *Bombus*), e está dividida em três artigos. **No artigo I**, o objetivo foi atualizar informações sobre a distribuição geográfica das espécies de *Bombus* presentes no Rio Grande do Sul e trazer informações sobre suas associações florais. Durante o período de coletas em campo foram identificadas duas espécies de *Bombus* (*B. morio* e *B. pauloensis*) em 32 municípios amostrados no Estado, associada a 16 espécies de plantas pertencentes a 11 famílias botânicas. **No artigo II**, o objetivo foi estudar o comportamento de visitação floral em *B. morio* e *B. pauloensis* por meio de análise palinológica de cargas de pólen corbicular de indivíduos capturados enquanto forrageavam em áreas de vegetação nativa e cultivada. As coletas foram realizadas no período da primavera e verão de 2017 a 2018. Foram identificados 54 tipos polínicos de plantas associadas às duas espécies de *Bombus*, pertencentes 98% a plantas e ervas nativas. **No artigo III**, o objetivo foi avaliar se existe resíduos de agrotóxicos em *Bombus* spp. coletados próximos a cultivos agrícolas e áreas urbanas, empregando-se o método QuEChERS modificado e LC-MS/MS e GC-MS/MS. Dos 119 agrotóxicos analisados, apenas azoxistrobina, acetamiprido e metomil, apresentaram resíduos detectáveis nas amostras analisadas.

Palavras-chave: *Bombus*. Distribuição. Flora associada. Pólen. Agrotóxicos.

ABSTRACT

TROPHIC RELATIONSHIPS AND PESTICIDES RESIDUES IN *BOMBUS* SPP. (HYMENOPTERA: APIDAE) IN RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: Jocélia Gonçalves da Silva
ADVISOR: Prof. Dr. Jerson Vanderlei Carús Guedes

About 70% of cultivated plants, which are used directly for human consumption, have increased production as a result of pollination promoted by animals, especially bees. Of the 141 plant species grown in Brazil - for use in human consumption, animal production, biodiesel and fiber - approximately 60% (85 species) depend to some extent on animal pollination. Pollination services in agricultural areas depend on both domesticated species and wild bee populations. Among the pollinators, it is possible to highlight the bees of the genus *Bombus*, popular as ground manga, and which are the important pollinators in native and cultivated areas, depending on the poles and nectar of a wide variety of plants. Visit configurations and feeding behavior of field pollinators are important to define a relationship between *Bombus* species and plants they exploit. In Rio Grande do Sul, they have been described as *Bombus morio* Swederus, *B. pauloensis* Friese, *B. bellicosus* Smith and *B. brasiliensis* Lepeletier, but in recent years, *B. brasiliensis* has not been found the most. Pointed and proven research or population decline of these bees in various countries of the world, mainly as a result of the intensification of agriculture. The research was developed, addressing the aspects explained above (*Bombus* bee), and is divided into three articles. **In article I**, the objective was to update information on the geographic distribution of *Bombus* species present in Rio Grande do Sul and to provide information on their floral associations. During the field collection period, two *Bombus* species (*B. morio* and *B. pauloensis*) were identified in 32 municipalities sampled in the State, associated with 16 plant species belonging to 11 botanical families. **In article II**, the objective was to study the behavior of floral visits in *B. morio* and *B. pauloensis* by means of palinological analysis of corbicular pollen loads of individuals captured while foraging in areas of native and cultivated vegetation. The collections were carried in the spring and summer from 2017 to 2018. 54 pollen types of plants were identified associated with two of *Bombus* species, belonging to 98% native plants and herbs. **In article III**, the objective was to evaluate if there is pesticide residues in *Bombus* spp. collected near agricultural crops and urban areas, using the modified QuEChERS method and LC-MS/MS and GC-MS/MS. Of the 119 pesticides analyzed, only azoxystrobin, acetamiprid and metomil, showed detectable residues in the analyzed samples.

Keywords: *Bombus*. Distribution. Associated Flora. Pollen. Pesticides.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 A – Distribuição espacial de <i>B. morio</i> e <i>B. pauloensis</i> sobre os diferentes sistemas ecológicos presentes no Rio Grande do sul; B – Influência de cada espécie no espaço e probabilidade de ocorrência de <i>Bombus</i> no Estado por meio do sistema de interpolação IDW; C – Representatividade espacial da ocorrência das espécies de <i>Bombus</i> de acordo com o sistema ecológico	44
---	----

ARTIGO 2

Figura 1 – Rede de interações entre <i>Bombus morio</i> , plantas visitadas e tipos polínicos encontrados nas corbículas. Rio Grande do Sul, 2017/18	68
Figura 2 – Rede de interações entre <i>Bombus pauloensis</i> , plantas visitadas e tipos polínicos encontrados nas corbículas. Rio Grande do Sul, 2017/18.	69
Figura 3A – Diagrama de porcentagem polínica das amostras de pólen coletados das corbículas de <i>Bombus morio</i> e <i>Bombus pauloensis</i> no Rio Grande do Sul (2017/18).	70
Figura 3B (continuação) – Diagrama de porcentagem polínica das amostras de pólen coletados das corbículas de <i>Bombus morio</i> e <i>Bombus pauloensis</i> no Rio Grande do Sul (2017/18)	71
Figura 4 – Tipos de plantas polinizadas por <i>Bombus morio</i> e <i>Bombus pauloensis</i>	71

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Municípios do Rio Grande do Sul com coletas de *Bombus* spp. e data de amostragem 42

Tabela 2 – Espécies de *Bombus* presentes no Rio Grande do Sul (*Bombus morio*, B. m. e *Bombus pauloensis*, B. p.) e a flora associada agrupada de acordo com a família (Consulta das famílias e tipos de plantas: RCPol e Flora do Brasil 2020) 47

ARTIGO 2

Tabela 1 – Plantas visitadas (%) e tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen coletados das corbículas de *Bombus morio* e *Bombus pauloensis* no Rio Grande do Sul (2017/18) 66

ARTIGO 3

Tabela 1 – Municípios da região central do Rio Grande do Sul com coletas de *Bombus* spp., recurso floral associado e data de amostragem 84

Tabela 2 – Determinação de resíduos de agrotóxicos em *Bombus morio* e *Bombus pauloensis* em 8 municípios do Rio Grande do Sul, Brasil 87

Tabela 3 – Classe, agrotóxico e suas respectivas toxicidades por contato e oral para as abelhas 91

LISTA DE GRÁFICO

ARTIGO 1

Gráfico 1 – Percentual de espécie de <i>B. morio</i> e <i>B. pauloensis</i> de acordo com intervalos de temperatura	45
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 ABELHAS	15
2.2 BOMBUS spp.	17
2.2.1 Flora associada à <i>Bombus</i>	18
2.2.2 Interação planta-polinizador confirmada por meio da Palinologia	19
2.3 DECLÍNIO DE POLINIZADORES	19
2.4 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS	21
2.5 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS	23
2.5.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos.....	23
2.5.2 Preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos.....	24
2.5.3 Método QuEChERS	24
2.5.4 Cromatografia Líquida e Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas	26
3 REFERÊNCIAS	26
TRABALHOS CIENTÍFICOS	
4 ARTIGO 1 - Distribuição Geográfica de Abelhas do Gênero <i>Bombus</i> e Flora Associada no Rio Grande do Sul, Brasil	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	48
REFERÊNCIAS	55
5 ARTIGO 2 - Identificação da Flora Utilizada por <i>Bombus morio</i> (Swederus, 1787) e <i>Bombus pauloensis</i> (Friese, 1913) (Hymenoptera: Apidae) por meio da Análise Palinológica de Cargas de Pólen Corbicular	59
INTRODUÇÃO	60
MATERIAL E MÉTODOS	61
RESULTADOS	63
DISCUSSÃO	72
REFERÊNCIAS	76
6 ARTIGO 3 - Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em <i>Bombus</i> spp. (Hymenoptera: Apidae) Empregando o Método Quechers Modificado e LC-MS/MS E GC-MS/MS	80
INTRODUÇÃO	82
MATERIAL E MÉTODOS	83
RESULTADOS	85
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS	96
CONSIDERAÇÕES FINAIS	100

1 INTRODUÇÃO

No mundo, cerca de 70% das plantas cultivadas, que são utilizadas diretamente para o consumo humano, têm aumento de produção em consequência da polinização promovida por animais, principalmente abelhas (KLEIN et al., 2007). No Brasil, das 141 espécies de plantas cultivadas – para uso na alimentação humana, produção animal, biodiesel e fibras – aproximadamente 60% (85 espécies) dependem, em certo grau, da polinização animal (GIANNINI et al., 2015a).

Estima-se que o valor econômico da polinização promovida por insetos corresponda a 9,5% do valor total da produção agrícola mundial, considerando-se a produção de 2005 de 100 culturas usadas diretamente para alimentação humana (GIANNINI et al., 2015a). O impacto econômico global anual desse serviço natural de polinização foi estimado em 200 trilhões de dólares (GALLAI et al., 2009), e levando-se em conta a produção agrícola brasileira de 2012, estimou-se o valor econômico da polinização para 44 culturas, que apresentam ganhos variados com a polinização animal, em aproximadamente 30% da produção total de 45 bilhões de dólares (CGEE, 2017), comprovando a importância além de ambiental, econômica dessa atividade.

Os serviços de polinização nas áreas agrícolas dependem tanto das espécies domesticadas quanto das populações de abelhas silvestres (GARIBALDI et al., 2013). Dentre os polinizadores, é possível destacar as abelhas do gênero *Bombus*, conhecidas popularmente como mamangavas de chão, e que são importantes polinizadores de muitas culturas, assim como de vegetação nativa. Elas são rápidas, podendo visitar o dobro de flores por minuto do que *Apis mellifera* visitaria. E, por serem grandes, podem transportar cargas mais pesadas, quando comparadas às abelhas de porte menor, permitindo visitarem muitas flores antes de voltarem à colônia, e conseguindo melhor contato com os estames e pistilos do que os insetos de menor tamanho (HEINRICH, 2000; KOPPERT, 2007). Além disso, as abelhas do gênero *Bombus* possuem língua longa o que permite polinizar flores com corolas profundas, como flores do feijoeiro e do trevo vermelho, além de apresentar o comportamento de vibrar as anteras para liberar o pólen (HEINRICH, 2000).

Os processos de expansão das áreas de produção e intensificação da agricultura têm ameaçado a biodiversidade e os serviços ecossistêmicos, inclusive a polinização (GARIBALDI et al., 2011). O declínio de polinizadores silvestres e domesticados, com reduções registradas no número de espécies desses animais e nos serviços de polinização em

diferentes regiões do globo, onde vários fatores estão associados ao declínio das populações silvestres desses insetos benéficos (POTTS et al., 2010).

Associadas aos declínios das populações de abelhas silvestres da última década têm sido registradas nos Estados Unidos mortalidades sucessivas de colônias manejadas de *A. mellifera* – em média 30% de perdas de colônias, em avaliações consecutivas efetuadas entre 2006 e 2010, conforme VANENGELSDORP et al. (2007, 2008, 2010, 2011) – e em alguns países da Europa (LAURENT et al., 2015).

No inverno de 2006 e 2007, verificou-se que colônias que entravam em colapso apresentavam características bem definidas, embora sem causa conhecida, com isso o fenômeno passou a ser tratado como uma síndrome e recebeu a denominação de “colony collapse disorder” (CCD), conforme VANENGELSDORP et al. (2009), traduzido como, distúrbio do colapso das colônias. Tendo como principais sintomas a perda rápida de abelhas operárias, evidenciada pelo enfraquecimento ou morte da colônia com excesso de crias, em comparação ao número de abelhas adultas; ausência de crias e abelhas adultas mortas dentro ou fora da colmeia; e ausência de invasão imediata da colmeia por pragas como, por exemplo, traças (VANENGELSDORP et al., 2009).

Os principais fatores associados à síndrome são os estresses causados por patógenos, manejo inadequado das colônias, uso de agrotóxicos, má nutrição e a combinação entre estes fatores (VANENGELSDORP et al., 2009). Nesse contexto, a pesquisa teve como objetivo realizar o levantamento atual das espécies de *Bombus* spp. no Rio Grande do Sul, entender o comportamento das espécies existentes e sua relação com os recursos florais nativos e introduzidos no Estado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ABELHAS

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera, existindo cerca de 20.000 espécies de abelhas no mundo, com maior distribuição nas regiões tropical e subtropical. No Brasil estima-se que existam mais de 2.500 espécies de abelhas distribuídas em cinco famílias (Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae e Megachilidae). Cada espécie apresenta uma característica própria e desempenha um papel particular na natureza (LIMA, 2005).

A organização social das abelhas apresenta níveis diferentes. Existem as sociais, em que ocorrem muitos indivíduos no mesmo ninho, desempenhando diferentes atividades ao

longo de suas vidas. Nesse sistema, as abelhas se dividem em machos e fêmeas, e estas em duas castas, as operárias e a rainha. Cada casta apresenta uma atividade, ou conjunto de atividades, como por exemplo, a função da rainha é manter a postura dos ovos no ninho, e das operárias proteger a rainha e ir em busca de alimentos. E existem as solitárias, as quais não apresentam divisão de castas e uma única fêmea constrói seu ninho sozinha, sem dividir essa tarefa com outra abelha (SILVA et al., 2014).

Para sua alimentação as abelhas utilizam diversos recursos retirados das flores. Os grãos de pólen, importante fonte de proteína e sais minerais; o néctar, principal fonte de carboidratos; e os óleos florais que constituem a fonte mais importante de lipídeos para as abelhas coletoras de óleos (SILVA et al., 2014).

A polinização é essencial a manutenção da biodiversidade e reprodução das angiospermas, por meio da transferência do grão de pólen de uma flor para outra (KLEIN et al., 2007) e pode ser de diversas formas. No entanto, os agentes biológicos (insetos, aves e mamíferos) são fundamentais à reprodução de grande parte das espécies de plantas com flores e, segundo estudos realizados por Ollerton et al. (2011), 87,5% das espécies conhecidas de plantas com flores, dependem em algum momento, de animais polinizadores. Porém, na agricultura o homem utiliza menos de 0,1% dessas espécies (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012), apesar da polinização ser fundamental na manutenção da biodiversidade e da composição florística do ecossistema (BIESMEIJER et al., 2006; POTTS et al., 2010).

Dessa forma, cerca de 75% da alimentação humana depende direta ou indiretamente de plantas polinizadas ou beneficiadas pela polinização animal (KLEIN et al., 2007). Por isso, mesmo quando se estuda uma espécie de polinizador (generalista, espécie chave, endêmica) em um bioma, ele está relacionado com as espécies de plantas locais, sendo fundamental para o funcionamento desse bioma (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012).

Algumas culturas dependem inteiramente de insetos polinizadores para produção de frutas e sementes; e outras tem uma dependência muito baixa, podendo produzir até 90% do seu potencial sem a visita de polinizadores (KLEIN et al., 2007). Das culturas que dependem de insetos polinizadores, as abelhas se destacam como principal polinizador biótico, polinizando cerca de 70% das espécies cultivadas no mundo (FAO, 2004).

Dentre as abelhas polinizadoras, podemos destacar as abelhas do gênero *Bombus*, conhecidas popularmente como mamangavas, e que são importantes polinizadores de muitas culturas, assim como de vegetação nativa. Elas são robustas, pilosas e frequentemente têm variações no padrão da coloração e no tamanho do corpo, podendo variar de 9 a 22 mm de

comprimento (MICHENER, 2000). Conhecem-se aproximadamente 250 espécies de *Bombus* (MICHENER, 2000; WILLIAMS, 1998). Dessas, 199 espécies estão na Ásia, 58 na Europa, 41 na América do Norte e 43 nas Américas Central e do Sul (MICHENER, 2000).

2.2 BOMBUS SPP.

Na Europa, a grande mudança para a utilização de novos polinizadores foi realizada na Holanda e na Bélgica, com a implantação de grandes companhias de criação em larga escala de abelhas do gênero *Bombus*, polinizadores eficientes de culturas agrícolas mantidas em ambiente protegidos (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006). Sua atividade comercial teve início em 1987, com a criação e multiplicação de colônias dessas abelhas em laboratório (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012). Além disso, essas companhias inovaram com a implantação de serviço de entrega dos ninhos diretamente aos agricultores e tiveram sucesso crescente com a venda de cerca de um milhão de colônias de abelhas *B. terrestris* apenas no ano de 2004 (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006).

Apesar das práticas de criação terem sido testadas em muitas das 250 espécies de abelhas, apenas cinco espécies (quatro pertencentes ao gênero *Bombus*) estão sendo utilizadas como polinizadores produzidos comercialmente em todo o mundo (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006). Embora *Bombus* sejam polinizadores eficientes de uma variedade de culturas, incluindo trevo vermelho, mirtileiro, kiwizeiro, amendoeira, macieira e pereira (THORP, 2003), aproximadamente 95% das colônias cultivadas comercialmente são utilizadas na produção de tomates (*Lycopersicon esculentum*) (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006), e pimentões doces (*Capsicum annuum*) (ERCAN; ONUS, 2003) em estufa.

Em estudos realizados em cultivo de tomateiro foi observado que a polinização por *B. pauloensis* aumentou em aproximadamente 30% a qualidade do fruto e número de sementes, em 40% o peso fresco, em 14,3% o diâmetro e em 42% na proporção de lóbulos bem desenvolvidos, quando comparados com frutos de tomate produzidos por autopolinização (ALDANA et al., 2007).

Meisels e Chiasson (1997) avaliaram a eficiência de *B. impatiens* como polinizadores de pimenteiro, em ambiente protegido, no Canadá. Verificaram que apenas três operárias dessa espécie de abelha são suficientes para polinizar efetivamente cerca de 425 plantas, ou aproximadamente, 176 abelhas por hectare (25.000 plantas). Esses resultados são animadores e revelam o potencial de abelhas do gênero *Bombus*, em ambiente protegido, para a polinização de diversas culturas (WILLIAMS, 2006).

Os benefícios para os produtores incluem custos reduzidos por não terem que polinizar mecanicamente, facilidade no monitoramento da atividade de *Bombus* spp., aumento do rendimento de frutos, pouco ou nenhuma necessidade do uso de agrotóxicos e melhor qualidade dos frutos, levando a preços de venda mais altos (VELTHUIS; VAN DOORN, 2006).

2.2.1 Flora associada à *Bombus*

Espécies desse gênero são considerados polinizadores eficientes de diversas culturas como berinjela, goiabeira, tomateiro, castanheira, maracujazeiro e aboboreira (GIANNINI et al., 2015b). Em pesquisa realizada no Campus da USP em São Paulo, Cortopassi-Laurino et al. (2003), revelaram uma ampla gama de famílias botânicas visitadas por *Bombus*, sendo elas: Acanthaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Balsaminaceae, Bignoniaceae, Bombacaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Iridaceae, Labiatae, Leguminosae, Liliaceae, Malvaceae, Melastomataceae, Rutaceae, Solanaceae, Sterculiaceae e Verbenaceae, respectivamente apresentadas em ordem decrescente de visitação floral.

Estudos comprovam que espécies de *Bombus* nativas preferem visitar plantas nativas, enquanto espécies de *Bombus* introduzidas têm sido encontradas preferindo visitar plantas introduzidas (GOULSON, 2003; GOULSON; HANLEY, 2004). Por isso é importante preservar as plantas nativas de forma a manter o ecossistema em harmonia com os polinizadores, dado o declínio global na abundância e diversidade de abelhas (COLLA; PACKER, 2008; WILLIAMS; OSBORNE, 2009).

Mudanças no habitat que alteram a distribuição dos recursos florais ou a qualidade dos recursos para nidificação, podem afetar o comportamento individual, a dinâmica da população e a composição da comunidade de abelhas (POTTS et al., 2010). No entanto que, a perda de habitat tem sido discutida como uma das principais causas para o declínio na riqueza e abundância de polinizadores em todo mundo (POTTS et al., 2010; WILLIAMS et al., 2010). Estudos mostram que regiões com a presença de fragmentos florestais maiores e mais preservados disponibilizam mais recursos essenciais para a manutenção das populações de polinizadores, incluindo substratos para construção dos ninhos e fontes de pólen e néctar (MORATO, 2004; WINFREE et al., 2009).

Dessa forma, é necessário que em paisagens agrícolas sejam mantidas áreas de florestas nativas próximas às áreas de cultivos, pois assim pode-se manter um fluxo de polinizadores entre áreas silvestres e agrícolas, aumentando a frequência de polinizadores e a

eficiência na polinização e, conseqüentemente, aumentando a taxa de frutificação e qualidade dos frutos (GARIBALDI et al., 2011; GARIBALDI et al., 2016).

2.2.2 Interação planta-polinizador confirmada por meio da Palinologia

É importante identificar de fato qual recurso floral está sendo utilizado por abelhas do gênero *Bombus* no intuito de proteger as espécies nativas. Para se identificar a origem do grão de pólen presente no corpo dos polinizadores, conta-se com a contribuição da palinologia, que é definida como a ciência que estuda os esporos das criptógamas e os grãos de pólen das fanerógamas. A Palinologia é reconhecida no século XX e desde então vem sendo aplicada em várias áreas de estudo (ERDTMAN, 1952; BARTH; MELHEM, 1988).

A Palinologia é responsável pelo estudo do pólen de angiospermas, esporos de pteridófitas e de fungos, cistos de algas, dinoflagelados, foraminíferos acritarcas e partículas de carvão. Ela também estuda pólen fósseis de eras passadas e atuais, frescos ou mantidos em herbários (CAMINHA; LEITE, 2015).

O avanço nos estudos em palinologia deu-se a partir do método da acetólise dos grãos de pólen proposto por Erdtman (1960), o que permitiu uma melhor descrição da exina (camada mais externa) quanto a sua ornamentação, posição e número das aberturas. Estas características fazem com que cada espécie de planta apresente morfologia própria do grão de pólen e particularmente da exina e, com isso, é possível estudar a taxonomia vegetal por meio da palinotaxonomia (ERDTMAN, 1952).

A partir de estudos de palinotaxonomia é possível a elaboração de glossários ou catálogos polínicos (PUNT et al., 2007; SILVA et al., 2014a) e com isso a identificação dos grãos de pólen, trazendo informações importantes sobre a interação planta-polinizador e auxiliando no planejamento de ações de manejo para a conservação de recursos florais utilizados por *Bombus* e assim, preservar também esses polinizadores. O conhecimento das fontes de pólen necessárias para populações de importantes polinizadores no Rio Grande do Sul, como as espécies de *Bombus*, é necessário para propor medidas visando à manutenção do habitat e dos recursos florais para conservação desse gênero de abelhas em áreas agrícolas e não agrícolas do Estado.

2.3 DECLÍNIO DE POLINIZADORES

Na agricultura é importante o uso de agrotóxicos para controlar plantas daninhas, fungos e insetos-praga, com o objetivo de assegurar sua produtividade. Os insetos

polinizadores não são alvos dos agrotóxicos, no entanto ao realizar suas atividades de coleta de água, resina de plantas, pólen e néctar das flores, podem ficar expostos a tais agentes químicos (THOMPSON, 2003), o que pode contribuir para o enfraquecimento de colônias de abelhas e diminuição da população de visitantes florais.

Alguns trabalhos relatam a presença de resíduos de agrotóxicos em pólen de plantas no campo, no pólen armazenado na colmeia e na cera de abelhas *Apis mellifera*, quando essas estavam próximas a culturas agrícolas (CHAUTZAT et al., 2010; KRUPKE et al., 2012).

A perda de polinizadores e dos serviços de polinização por eles prestados (ALLEN-WARDELL et al., 1998; KEARNS; INOUE; WASER, 1998), são temas de várias pesquisas. Essas discussões são baseadas nas evidências do declínio no número de polinizadores locais e regionais em diferentes partes do mundo (BIESMEIJER et al., 2006), da alta taxa de extinção de diversas espécies, em diferentes grupos (MILLENIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT, 2005), além do registro de perdas significantes na população dos polinizadores manejados (ALLEN-WARDELL et al., 1998).

Uma perda alarmante de colônias de *A. mellifera* foi relatada na Costa Leste dos Estados Unidos em outubro de 2006, causando prejuízos sem precedentes (JOHNSON, 2010). Esse fenômeno, denominado desordem do colapso da colônia (DCC), consiste na perda rápida e inexplicável de abelhas *A. mellifera* adultas de uma colmeia (RATNIEKS; CARRECK, 2010; UNDERWOOD; VANENGELSDORF, 2007). Esse declínio foi reportado principalmente na Europa (POTTS et al., 2010) e América do Norte (VAN EAGLESDORPS et al., 2009).

O declínio de populações de algumas espécies de *Bombus* também tem sido documentado, principalmente na Grã-Bretanha e nos Estados Unidos (GOULSON et al., 2008), observado principalmente em áreas nas quais ocorreram mudanças no habitat pela ação antrópica, como intensificação da agricultura e urbanização (PYWELL et al., 2006).

As abelhas desse gênero atuam como importantes polinizadores tanto para a flora natural quanto para plantas de interesse econômico (PYWELL et al., 2006; GOULSON et al., 2008), e o declínio dessas abelhas pode acarretar em sérios prejuízos a vários setores da economia (BIESMEIJER et al., 2006; CARVELL, 2006). No Brasil são escassas as informações sobre o *status* das populações de *Bombus*, como consequência, não há uma política de proteção e manejo para esses polinizadores (FRANÇOSO, 2014).

As abelhas estão expostas aos agrotóxicos e tornam-se vulneráveis a contaminação, o que pode acarretar ao desequilíbrio da população e afetar suas atividades (MALASPINA et

al., 2008; THOMPSON, 2003). É necessário conhecer como os tratamentos culturais podem prejudicar a saúde das colmeias, modificam seu comportamento, e as tornam mais suscetíveis aos patógenos e parasitas, que podem causar sua morte. No entanto, na maioria das vezes em que é constatada a mortalidade de polinizadores, não são realizadas análises para a comprovação se houve ou não intoxicação por agrotóxicos (PINHEIRO; FREITAS, 2010), logo deixa-se de se conhecer a verdadeira causa da morte.

No Rio Grande do Sul já foram descritas quatro espécies de *Bombus*, *B. morio* Swederus, *B. pauloensis* Friese, *B. bellicosus* Smith e *B. brasiliensis* Lepeletier, no entanto, de acordo com o Catálogo Online de Abelhas Moure, com a última atualização em 2012 (MOURE; MELO, 2012), *B. brasiliensis* não se encontra mais presente no Estado. O Rio Grande do Sul é um estado rico em extensão de áreas nativas e cultivadas, nas quais muitas das plantas com flores dependem da ajuda de polinizadores para aumentar sua produção e melhorar a qualidade de frutos, grãos e sementes produzidos, tornando-se importante a preservação das espécies de *Bombus* presentes no Estado.

2.4 RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS

Na agricultura baseada no alto uso de insumos, o controle de pragas e doenças está centrado principalmente no uso de diversas classes de agrotóxicos, como herbicidas, fungicidas e inseticidas entre outros (PIRES et al., 2016). A intoxicação das abelhas por agrotóxicos era relacionada exclusivamente à exposição letal (intoxicação aguda), que resulta em indivíduos mortos próximos às colônias. No entanto é crescente a preocupação com as possíveis consequências dos efeitos subletais às abelhas, aqueles que não levam a morte imediata, mas podem afetar o comportamento, o desenvolvimento e o sistema imunológico, alterando a capacidade de combater infecções e causando problemas crônicos provocados por exposição a longo prazo (WHITEHORN et al., 2012).

Vários estudos têm relacionado o crescente uso de agrotóxicos e seus efeitos subletais com o fenômeno da Desordem do Colapso das Colônias (DCC) em *A. mellifera*, no hemisfério norte, principalmente aos agrotóxicos do grupo dos neonicotinoides (GOULSON, 2015). Os agrotóxicos desta classe já foram relacionados a alterações comportamentais e morfofisiológicas (SUCHAIL et al., 2001; DECOURTYE et al., 2004) que afetam a capacidade de forrageamento (YANG et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2012), aprendizagem (DECOURTYE et al., 2004) e vigor da colônia de *A. mellifera* (WHITEHORN et al., 2012).

Desde os primeiros registros de declínio de *A. mellifera* no continente norte americano, no inverno de 2006 e 2007, verificou-se que colônias que entravam em colapso apresentavam características bem definidas, embora sem causa conhecida (PIRES et al., 2016). Por ser reconhecido somente após o ocorrido e por meio de um conjunto de sintomas, o fenômeno passou a ser tratado como uma síndrome (Colony Collapse Disorder - CCD), conforme VanEngelsdorp et al. (2009).

Estudos têm mostrado que as abelhas estão expostas a uma ampla gama de agrotóxicos (MULLIN et al., 2010; PETTIS et al., 2013) e que alguns deles têm efeitos sinérgicos com outros agrotóxicos ou com parasitas ou patógenos que acometem as abelhas (PETTIS et al., 2013). O uso de neonicotinóides em canola (*Brassica napus*) e perdas de colônias ocorridas no Reino Unido foram investigados no período de 2000 a 2010 e foi encontrada relação significativa entre o uso de imidacloprido (inseticida do grupo dos neonicotinóides) e perdas de colônias de *A. mellifera* (BUDGE et al., 2015).

É conhecido o efeito de alguns agrotóxicos sob abelhas do gênero *Bombus*, como por exemplo, de acordo com estudos realizados por Tasei et al. (2000), o imidacloprido diminui a emergência de larvas; e segundo De Wael et al. (1995), o trifluzuron diminui o desenvolvimento dos ovos. Estudos têm mostrado também uma gama de efeitos letais e subletais resultantes da exposição a diferentes doses de neonicotinóides (BLACQUIERE et al., 2012).

Aplicação tópica e oral de neonicotinóides contendo nitro (incluindo thiametoxam), demonstrou-se ser mais tóxico para as abelhas do gênero *Apis* do que os que contêm um cianogruppo como o tiacloprido (ISAWA et al., 2004; LAURINO et al., 2011). A mudança no comportamento afeta negativamente a eficiência de forrageamento e pode reduzir significativamente o crescimento de colônia (THOMPSON; MAUS, 2007); a exposição a neonicotinóide resultou em sintomas como paralisia, tremor, movimento descoordenado e hiperatividade (LAMBIN et al., 2001; COLIN et al., 2004).

Uma toxicidade relativamente semelhante aos nitro e ciano-neonicotinóides foi observado em *B. terrestris* após exposição crônica de microcolônias (MOMMAERTS et al., 2010). Metabólitos de alguns neonicotinóides, incluindo a clotianidina, que é um subproduto do tiametoxam, também contribuem para toxicidade (NAUEN et al., 2003).

As consequências da exposição em campo resultam da combinação de vários efeitos, por exemplo, colônias de *B. impatiens* forrageando em plantas tratadas com imidacloprido apresentaram uma redução na taxa de desenvolvimento do ninho (câmaras de

ninhada, potes de mel e biomassa de operárias) e da atividade de forrageamento (GELS et al., 2002). Dessa forma, faz-se necessários estudos que comprovem se as espécies de *Bombus* presentes no Rio Grande do sul estão sendo contaminadas ou não com as aplicações de agrotóxicos utilizados nas culturas agrícolas.

2.5 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ABELHAS

2.5.1 Técnicas cromatográficas para determinação de resíduos de agrotóxicos

Diferentes metodologias vêm sendo desenvolvidas para a determinação de resíduos de agrotóxicos, principalmente em alimentos, mas também em amostras de abelhas. Dentre as técnicas para determinação de resíduos de agrotóxicos destacam-se a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida (SAIBT, 2017).

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua interação entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida em uma coluna, sendo esta aplicada à análise de compostos voláteis ou volatizáveis que sejam termicamente estáveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A maioria dos compostos não são suficientemente voláteis para ser analisados por Cromatografia Gasosa, com isso a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) tem tido grande destaque. Na HPLC o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel (líquida) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2009; HARRIS, 2012).

A cromatografia pode ser combinada a diferentes sistemas de detecção, tratando-se de uma das técnicas analíticas mais utilizadas e de melhor desempenho. O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008).

O princípio básico da espectrometria de massas é gerar íons de compostos orgânicos ou inorgânicos através de algum método adequado, para separar esses íons pelas suas razões massa/carga (m/z) e detectá-los qualitativa e quantitativamente (GROSS, 2004). As fontes de ionização mais utilizadas em cromatografia líquida são ionização por eletronebulização ESI

(do inglês *electrospray ionization*) e ionização química à pressão atmosférica, APCI (do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) (LANÇAS, 2009).

Dentre as técnicas de operação para obtenção do espectro de massas em MS/MS, estão varredura completa (do inglês, *Full scan*), Monitoramento do Íon Seleccionado (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*), Varredura do Íon Produto, Varredura do Íon Precursor e Monitoramento Seletivo de Reações (SRM, do inglês *Select Reaction Monitoring*). No modo de varredura SRM é monitorada a fragmentação de um íon precursor seleccionado no Q1 e seus correspondentes íons produto que são filtrados em Q3. Este método permite que o equipamento focalize apenas o precursor e o produto, aumentando a sensibilidade para o monitoramento, associado ao aumento na seletividade (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

2.5.2 Preparo de amostra para determinação multirresíduo de agrotóxicos

O desenvolvimento de procedimentos para o preparo de amostras tem utilizado várias técnicas e sendo constantemente estudado devido a grande variedade de agrotóxicos utilizados na agricultura e as diferentes complexidades das matrizes. Tipicamente, o preparo de amostras visa extrair os analitos da amostra a ser analisada, e esse procedimento varia com o grau de seletividade, velocidade e conveniência. A otimização do preparo de amostras é de fundamental importância para a obtenção de resultados exatos e precisos. Idealmente, a técnica de preparo de amostras deve ser rápida, de baixo custo, de fácil execução e ser compatível com o instrumento analítico (BORGES et al., 2015).

Além de concentrar/isolar o analito, o preparo de amostras tem como objetivo eliminar os interferentes, porém são necessários métodos que sejam simples, baratos, rápidos, que empreguem pequenas ou nenhuma quantidade de solventes e, principalmente, sejam compatíveis com o instrumento analítico. Dessa forma, as tendências apontam no sentido de miniaturização das técnicas de preparo de amostras, visando à proteção ambiental e à diminuição dos custos das análises, usando uma quantidade mínima ou nula de solventes orgânicos (BORGES et al., 2015).

2.5.3 Método QuEChERS

O Método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) é um método utilizado para o preparo de amostras objetivando a determinação de multirresíduo de agrotóxicos em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas (PRESTES et al., 2009). Esse método foi desenvolvido por Anastassiades et al. (2003)

proporcionando as amostras analisadas resultados de alta qualidade com um número mínimo de etapas e um baixo consumo de solventes e colunas, tendo as vantagens de ser um método rápido, fácil, barato, eficiente, robusto e seguro.

O objetivo deste método é atender aos Limites Máximos de Resíduos, estabelecidos pelas legislações internacionais e nacionais, e atender a obtenção de extratos que podem ser analisados por Cromatografia Líquida e/ou Gasosa acopladas à detector de Massas (LC-MS/MS e GC-MS/MS) (NIELL, 2014).

Esse método resume-se nas etapas de extração, partição e limpeza. A primeira etapa do método usa um solvente orgânico, que possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extrativos lipofílicos provenientes da amostra. Estudos indicam que a acetonitrila tem vantagem de analisar em LCMS/MS do que a acetona e acetato de etila e pode ser utilizada também em sistemas de GC-MS/MS (ANASTASSIADES et al., 2003).

Com o uso da acetona, a partição é controlada com a adição de cloreto de sódio e solventes apolares, porém a desvantagem neste processo é a diluição do extrato e o consumo de um maior volume de solventes. Já o uso de acetonitrila, não requer a adição de solventes apolares no processo de partição. Conforme o solvente utilizado na etapa de partição obtêm-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares (PRESTES, 2011).

Para a segunda etapa é empregado o uso de sais secantes como sulfato de sódio. Além deste sal, pode ser utilizado o sulfato de magnésio, que possui maior capacidade de remover água quando comparado a outros sais, além disso, este sal reduz o volume na fase aquosa, ocorrendo no processo de hidratação uma reação exotérmica, aquecendo a amostra entre 40 a 45°C durante as etapas de extração/partição (ANASTASSIADES et al., 2003). A adição de sais neste processo é frequentemente usado devido à rapidez, facilidade e baixo custo, além de não diluir o extrato da amostra e proporcionar uma separação das fases orgânica e aquosa (PRESTES, 2011).

Após a adição dos sais e do tampão, é realizada a etapa de limpeza, a qual tem como o objetivo, reduzir as interferências da matriz e os limites de detecção. O adsorvente utilizado tem por objetivo remover os ácidos graxos, açúcares e outros co-extratos da matriz, através de ligações de hidrogênio. Porém pode resultar na perda parcial de alguns compostos, bem como no aumento dos custos e de tempo de extração dos agroquímicos. Além disso, uma limpeza má condicionada leva a efeitos adversos relacionados à qualidade dos dados gerados, mascarando os picos dos agroquímicos por componentes que co-eluem da matriz, gerando falsos positivos e quantificação incorreta (LEHOTAY et al., 2010; NIELL, 2014).

A aplicação do método QuEChERS tem sido reportada para análise multirresíduo de agrotóxicos em vários alimentos. Hernández-Borges et al. (2009) utilizaram QuEChERS e *Gas Chromatography Nitrogen and Phosphorus Detector* (CG-NPD) para a determinação de onze agrotóxicos em banana. Também com este método, foram quantificados 36 agrotóxicos em mel, através de *Gas Chromatography Electron Capture Detector* (GC-ECD) e *Gas Chromatography Nitrogen and Phosphorus Detector* (GC-NPD) (BARAKAT et al., 2007). Também foi utilizado o método QuEChERS para extrair diflubenzurona e triflumurona em tomate, através de LC acoplada a sistema de fotoderivatização pós-coluna com detector de quimioluminescência (LEHOTAY, 2007).

2.5.4 Cromatografia Líquida e Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

As análises realizadas por Cromatografia Gasosa (CG) são apropriadas para compostos voláteis e termicamente estáveis. Contudo, muitos compostos não apresentam estas características, além de serem muito polares. Desta forma, esses compostos podem ser separados pela técnica de Cromatografia Líquida (CL) (ALDER et al., 2006).

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais utilizadas na determinação de compostos não voláteis. Porém, apesar de ser uma excelente técnica de separação, necessita de uma técnica confirmatória quando a análise for qualitativa (LANÇAS, 2009).

O acoplamento da cromatografia líquida com o espectrômetro de massas permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de vários compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares, pela movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Essa movimentação ocorre pela separação dos íons de acordo com sua relação massa/carga (m/z). Este acoplamento permite um aumento da seletividade e sensibilidade (SKOOG et al., 2008).

3 REFERÊNCIAS

- ALDANA, J. et al. Efecto de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) sobre la productividad de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo invernadero en la Sabana de Bogotá, Colombia. **Agronomía Colombiana**. v. 25, p. 62-72, 2007.
- ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS. **Mass Spectrometry Reviews**, Berlin, v. 25, n. 6, p. 838-865, 2006.

ALLEN-WARDELL, et al. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. **Conservation Biology**, v. 12, p. 8-17, 1998.

ANASTASSIADES, M.; et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, Fellbach, v. 86, p. 412-431, 2003.

BARAKAT, A. A. et al. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. **International Journal of Food, Agriculture & Environmental**, v. 5, p. 97, 2007.

BARTH, O. M.; MELHEM, T. S. **Glossário ilustrado de palinologia**. Campinas, Ed. Unicamp, 1988. 75 p.

BIESMEIJER, J. C. et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**. v. 313, p. 351-354, 2006.

BLACQUIERE, T., SMAGGHE, G., VAN GESTEL, C.A.M., MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side effects and risk assessment. **Ecotoxicology**. v. 21, n. 4, p. 973-992, 2012.

BORGES, B. K.; PEREIRA, C. A.; MANO, V. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, cap 1, 2015.

BUDGE, G. E.; GARTHWAITE, D.; CROWE, A.; BOATMAN, N. D.; DELAPLANE, K. S.; BROWN, M. A.; THYGESEN, H. H.; PIETRAVALLE, S. Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. Article number 12574, **Scientific Reports**. v. 5, 2015.

CAMINHA, S. A. F. S.; LEITE, F. P. R. Microfosséis: pequenos organismos que geram grandes informações sobre o passado. **Ciência & Cultura**, v. 67, n. 4, p. 24-27, 2015.

CARVELL, C. Habitat use and conservation of bumblebees (*Bombus* spp.) under different grassland management regimes. **Biological Conservation**. v. 103, p. 33-49, 2006.

CGEE (Centro de Gestão e Estudos Estratégicos). **Importância dos polinizadores na produção de alimentos e na segurança alimentar global** - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2017.

CHAUZAT, M. P. et al. A case control study and a survey on mortalities of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in France during the winter of 2005-6. **Journal of Apicultural Research**. v. 49, p. 40-51, 2010.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

- COLIN, M. E., et al. A method to quantify and analyze the foraging activity of honey bees: relevance to the sublethal effects induced by systemic insecticides. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** v. 47, p. 387-395, 2004.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia, 2 ed, **Unicamp**:Campinas, cap: 8 e 9, 2009.
- COLLA, S. R.; PACKER, L. Evidence for decline in eastern North American bumble bees (Hymenoptera:Apidae), with special focus on *Bombus affinis* Cresson. **Biodiversity and Conservation.** v. 17, p. 1379-1391, 2008.
- DE WAEL, L.; DE GREEF, M.; VAN LAERE, O. Toxicity of pyriproxifen and fenoxycarb to bumble bee brood using a new method for testing insect growth regulators. **Journal of Apicultural Research**, v. 34, p. 3-8, 1995.
- DECOURTYE, A.; et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v.57, p. 410-419, 2004.
- ERCAN, N.; ONUS, A. N. The effects of bumblebees (*Bombus terrestris* L.) on fruit quality and yield of pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in an unheated greenhouse. **Israel Journal of Plant Sciences.** v. 51, p. 275-283, 2003.
- ERDTMAN, G. Pollen morphology and plant taxonomy. Waltham, **Chronica Botânica Co**, 1952.
- ERDTMAN, G. The acetolized method. A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift.** v. 54, p. 561-564, 1960.
- FAO. **Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture: the international response.** In: FREITAS, B. M.; PEREIRA, J. O. P. (Ed.). Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: UFC: Imprensa Universitária, 2004. 2-19 p.
- FRANÇOSO, E. **Filogeografia de *Bombus morio* e *B. pauloensis* (Hymenoptera, Apidae).** 2014. 180p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2014.
- GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics.** v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.
- GARIBALDI, L. A. et al. Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. **Ecology Letters.** v. 14, p. 1062-1072, 2011.
- GARIBALDI, L. A. et al Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. **Science.** v.339, p.1608-1611, 2013.
- GARIBALDI, L. A.; et al. Mutually beneficial pollinator diversity and crop yield outcomes in small and large farms. **Science.** v. 351, n. 6271, p. 388-391, 2016.

- GELS, J. A., HELD, D. W., POTTER, D. A. Hazards of insecticides to the bumble bee *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) foraging on flowering white clover in turf. **J. Econ. Entomol.** v. 95, p. 722-728, 2002.
- GIANNINI, T. C. et al. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **J. Econ. Entomol.** n.108, p. 849-857. 2015a.
- GIANNINI, T. C. et al. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie.** v. 46, p. 209-223, 2015b.
- GOULSON, D. **Bumblebees: their behaviour and ecology.** Oxford University Press, Oxford, 2003. 235 p.
- GOULSON, D.; HANLEY, M. Distribution and forage use of exotic bumble bees in South Island, New Zealand. **New Zealand Journal of Ecology.** v. 28, p. 225-232, 2004.
- GOULSON, D. et al. Decline and conservation of bumble bees. **Annual Review of Entomology.** v. 53, p. 191-208, 2008.
- GOULSON, D. Neonicotinoids impact bumblebee colony fitness in the field: a reanalysis of the UK's Food & Environment Research Agency 2012 experiment. **Peer J.** v. 3, p. 854, 2015.
- GROSS, J. H. Mass spectrometry. A textbook. 1 ed. Alemanha: **Springer**, 2004.
- HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. 8 ed. Rio de Janeiro: **LTC**, 2012.
- HEINRICH, B. **Bumblebee Economics.** Harvard College. United State of America, 2000.
- HOLLER, J. F.; SKOOG, D. A.; CROUCH R. S. P Princípios de Análise Instrumental. 6 ed. São Paulo: **Bookman**, 2009.
- IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. **Polinizadores no Brasil:** Contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. Parte 1: Polinizadores e Polinização – um Tema Global, 2012.
- ISAWA, T., et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection.** v. 23, p. 371-378, 2004.
- JOHNSON, R. **Honey Bee Colony Collapse Disorder, 2010.** Disponível em: <<http://www.fas.org/sgp/crs/misc/RL33938.pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2019.
- KEARNS, C. A.; INOUE, D. W.; WASER, N. M. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** n. 29, p. 83-112, 1998.
- KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences.** v. 274, p. 303-313, 2007.
- KOPPERT, B. V. **Koppert Biological Systems.** Natural Pollination. The Netherlands, 2007. Disponível em <<http://www.koppert.nl/e003.shtml>> Acesso em: 10 out. 2018

KRUPKE, C. H. et al. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS ONE**, 2012.

LAMBIN, M., ARMENGAUD, C., RAYMOND, S., GAUTHIER, M. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* v. 48, p. 129-134, 2001.

LANÇAS, M. F., et al. A cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica.** v. 1, p. 35-61, 2009.

LAURENT, M., HENDRIKX, P., RIBIERE-CHABERT, M., CHAUZAT, M.P. A pan-European epidemiological study on honeybee colony losses 2012-2014. 2015. Available at: <Available at: http://ec.europa.eu/food/animals/live_animals/bees/docs/bee-report_2012_2014_en.pdf >. Accessed on: 12 Mai. 2018.

LAURINO, D., PORPORATO, M., PATETTA, A., MANINO, A. Toxicity of neonicotinoids insecticides to honey bees in laboratory tests. **Bull. Insectol.** v. 64, p. 107-113, 2011.

LEHOTAY, S. J. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. **Journal of AOAC International.** v. 90, p. 485, 2007.

LEHOTAY, S.J., et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal Chromatography A.** v. 121, p. 2548-2560, 2010.

LIMA, S. A. M. **A apicultura como alternativa social, econômica e ambiental para a XI mesorregião do noroeste do Paraná.** Dissertação Mestrado. Curso de Pós-graduação em Engenharia Florestal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2005. 96 p. Acesso em www.floresta.ufpr.br/pos-graduacao/defesas/pdf.../d442_0620-M.pdf em 30 nov. 2019.

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F. Reflexos das aplicações de agrotóxicos nos campos de cultivo para a apicultura brasileira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 27.; e MELIPONICULTURA, 3.; Belo Horizonte, 2008. **Anais...** Belo Horizonte, 2008.

MEISELS, S.; CHIASSON, H. Effectiveness of *Bombus impatiens* Cr. as pollinators of greenhouse sweet peppers (*Capsicum annuum* L.). **Acta Horticulturae.** v. 437, p. 425-429, 1997.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World.** Baltimore. Johns Hopkins University Press, 2000. 913 p.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. **Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity Synthesis.** Washington. World Resources Institute, 2005.

MOMMAERTS, V. et al. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impaired foraging behaviour. **Ecotoxicology.** v. 19, n. 1, p. 207-215, 2010.

MORATO, E. F. **Efeitos da sucessão florestal sobre a nidificação de vespas e abelhas solitárias**. 2004. 266 p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

MOURE, J. S.; MELO, G. A. R. Bombini Latreille, 1802. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**, 2012. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>> Acesso em: 22 out. 2018.

MULLIN, C.A. et al. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS One**. v. 5, n. 3, e9754, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>

NAUEN, R. et al. Thiamethoxam is neonicotinoids precursor converted to clothianidin in insects and plants. **Pest. Biochem. Physiol.** v. 76, p. 55-69, 2003.

NIELL, S., et al. QuEChERS-Based Method for the Multiresidue Analysis of Pesticides in Beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF. **Journal Agriculture Food Chemistry**. v. 62, n. 17, p. 3675–3683, 2014.

OLLERTON, J. et al. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**. v. 120, p. 321-326, 2011.

PETTIS, J. S. et al. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**. v. 8, e70182, 2013.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Lethal effects of agricultural pesticides on pollinators and management perspectives for Brazilian agroecosystems. **Oecologia Australis**. v. 14, p. 266-281, 2010.

PIRES, C. S. S. et al. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília. v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

POTTS, S. et al. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

PRESTES, O. D.; FRIGGI C. A.; ADAIME M. B.; ZANELLA, R. **Química Nova**. v. 32, n. 6. São Paulo, 2009.

PRESTES, D. O. **Método rápido para a determinação simultânea de resíduos de agrotóxicos e medicamentos veterinários em alimentos de origem animal por LC-MS/MS**. 2011. Dissertação (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

PUNT, W. et al. Glossary of pollen and spore terminology. **Review of Paleobotany and Palynology**. v. 143, n. 1-2, p. 1-81, 2007.

PYWELL, R. F. et al. Effectiveness of new agri-environment schemes in providing foraging resources for bumble bees in intensively farmed landscapes. **Biol. Conserv.** v. 129, p. 192-206, 2006.

RATNIEKS, F. L. W.; CARRECK, N. L. Clarity on Honey Bee Collapse. **Science**. v. 327, n. 5962, p. 152-153, 2010.

RIGOTTO R. **Conflitos ambientais MG**. UFMG, 2014.
<https://conflitosambientaismg.lcc.ufmg.br/wp-content/uploads/2014/04/TAMC-RIGOTTO Raquel - Agrotóxicos.pdf>

SAIBT, N.. **Determinação Multirresíduo de Agrotóxicos em Abelha e Pólen Apícola Empregando Método Quechers Modificado e LC-MS/MS**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

SCHNEIDER, C. W. et al. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PloS One**. v.7, e30023, 2012.

SILVA, C. I. et al. **Catálogo polínico das plantas usadas por abelhas no campus da USP de Ribeirão Preto**. Holos, 2014a. 153 p.

SILVA, I. C.; ALEIXO, P. K.; SILVA, N. B.; FREITAS, M. B.; FONSECA, I. L. **Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras no Brasil**. São Paulo, Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, 2014.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Cengage Learning, 8 ed., São Paulo, p.999, 2008.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. GC-MS: Más de um Analizador de Masas, para qué? **Scientia Chromatographica**, v. 2, p.25, 2010.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Toxicity of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. **Colloques de l'INRA**. v. 98, p. 121-126, 2001.

TASEI, J. N.; LERIN, J.; RIPAULT, G. Sub-lethal effects of imidacloprid on bumblebees, *Bombus terrestris* (Hymenoptera:Apidae) during a laboratory feeding test. **Pest Management Science**. v. 56, p. 784-788, 2000.

THOMPSON, H. M. Behavioural effects of pesticides in bees – their potential for use in risk assessment. **Ecotoxicology**. v. 12, p. 317-330, 2003.

THOMPSON, H.M., MAUS, C. The relevance of sublethal effects in honey bee testing for pesticide risk assessment. **Pest Manage. Sci**. v. 63, p. 1058-1061, 2007.

THORP, R. W. Bumble bees (Hymenoptera: Apidae): commercial use and environmental concerns. In K. Strickler and J.H. Cane (Eds.) For Non-native Crops, Whence Pollinators of the Future? Proceedings of Thomas Say Publications in Entomology. **Entomological Society of America**. p. 21-40, 2003.

UNDERWOOD R. B.; VAN ENGELSDORP, D. **Colony Collapse Disorder: Have We Seen This Before?**. 2007. Disponível em: www.beeeculture.com/content/ColonyCollapseDisorder. cfm Acesso em: 29 jan. 2019.

- VANENGELSDORP, D.; UNDERWOOD, R.; CARON, D.; HAYES JR, J. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006– 2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. **American Bee Journal**. v. 147, p. 599-603, 2007.
- VANENGELSDORP, D.; HAYES JR., J.; UNDERWOOD, R.M.; PETTIS, J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. **PLoS s One**. v. 3, e4071, 2008. DOI: 10.1371/ journal.pone.0004071.
- VANENGELSDORP, D. et al. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PLoS One**. v. 4, p. 64-81, 2009.
- VANENGELSDORP, D.; HAYES JR., J.; UNDERWOOD, R.M.; PETTIS, J.S. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. **Journal of Apicultural Research**. v. 49, p. 7-14, 2010. DOI: 10.3896/IBRA.1.49.1.03
- VANENGELSDORP, D.; HAYES JR., J.; UNDERWOOD, R.M.; CARON, D.; PETTIS, J. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. **Journal of Apicultural Research**. v. 50, p. 1-10, 2011. DOI: 10.3896/IBRA.1.50.1.01.
- VELTHUIS, H. H. W.; VAN DOORN, A. (**In press**). A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. **Apidologie**. v. 37, n. 4, p. 421-451, 2006.
- WHITEHORN, P. R. et al. Neonicotinoid pesticide reduces bumblebee colony growth and queen production. **Science**. v. 336, p. 351-352, 2012.
- WILLIAMS, P. H. An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). **Bulletin of The Natural History Museum (Entomology)**. v. 67, p. 79-152, 1998.
- WILLIAMS, I. H. **Insect pollination and crop production: a European perspective**. In: KEVAN, P. G.; IMPERATRIZFONSECA, V. L. (Eds.) *Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature*, 2006. 65-71 p.
- WILLIAMS, P. H.; OSBORNE, J. L. Bumble bee vulnerability and conservation world-wide. **Apidologie**. v. 40, p. 367-387, 2009.
- WILLIAMS, N. M.; et al. Ecological and life-history traits predict bee species responses to environmental disturbances. **Biological Conservation**. v. 143, p. 2280-2291, 2010.
- WINFREE, R.; et al. A metaanalysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. **Ecology**. v. 90, n. 8, p. 2068-2076, 2009.
- YANG, E. C. et al. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**. v. 101, p. 1743-1748, 2008.

4 ARTIGO 1

Neotropical Entomology
Ecologia, Comportamento e Bionomia

Distribuição Geográfica de Abelhas do Gênero *Bombus* e Flora Associada no Rio Grande do Sul, Brasil

JG SILVA¹, M BECHE¹, CR PERINI¹, L AITA¹, JG SILVA², R FROEHLICH³, JVC GUEDES¹

¹Departamento de Proteção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

²Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil

³Colégio Politécnico, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

Os animais polinizadores são importantes para o processo de polinização, influenciando de forma direta ou indireta na produção de diversos alimentos. Entre os polinizadores, as abelhas do gênero *Bombus* se destacam por serem eficientes polinizadoras de diversas culturas agrícolas. As observações de visitação e comportamento alimentar dos polinizadores em campo são importantes para estabelecer a relação entre as espécies de *Bombus* e as plantas por elas exploradas, uma vez que, pesquisas apontam e comprovam a redução populacional dessas abelhas. Com isso, objetivou-se realizar um levantamento das espécies do gênero *Bombus* e sua distribuição geográfica no Estado, bem como sua relação com as plantas hospedeiras e recursos florais. A pesquisa para identificação das espécies de *Bombus* e a flora associada a elas ocorreu em 48 municípios abrangendo várias regiões do Estado. As coletas foram realizadas na primavera e verão no período de 2017 a 2019, diretamente no recurso floral visitado pelos *Bombus* spp. durante o forrageamento. Foram identificadas duas espécies, *Bombus (Thoracobombus) morio* Swederus (1787) e *Bombus (Thoracobombus) pauloensis* Franklin (1913), em 32 municípios, associadas a 17 espécies de plantas pertencentes a 11 famílias. *B. morio* foi coletado visitando recursos florais de 14 espécies de plantas (09 nativas, 04 introduzidas e 01 cultivada) pertencentes a 09 famílias e *B. pauloensis* foi coletado visitando recursos florais de 11 espécies de plantas (05 nativas, 04 introduzidas e 02 cultivadas), pertencentes a 08 famílias. Em 16 municípios amostrados não foi verificada a presença de *Bombus*. Verificou-se que as espécies de *Bombus* estão amplamente distribuídas no Estado, ocupando diversos sistemas ecológicos, e que a espécie *B. pauloensis* possui maior adaptabilidade a diversas faixas de temperaturas (10,88–15,5°C; 15,5–20,5°C; 20,5–25,5°C; 25,5–28,5°C), enquanto que *B. morio* foi encontrada em maior quantidade (69%) no intervalo de temperatura de 20,5°C e 25,5°C.

Palavras-chave: levantamento, *Bombus* spp., recurso floral, polinização

INTRODUÇÃO

Os animais polinizadores desempenham um papel fundamental para a produção de alimentos (Klein & Raemakers 2008). Entre os polinizadores, as abelhas do gênero *Bombus* se destacam por serem consideradas eficientes polinizadoras de diversas culturas agrícolas como berinjaleira, goiabeira, tomateiro, castanheira, maracujazeiro e aboboreira (Gianini *et al* 2015).

As abelhas desse gênero são mamangavas eusociais primitivas pertencentes à família Apidae e à tribo Bombini (Michener 2007). Aproximadamente 250 espécies de *Bombus* estão identificadas no mundo (Michener 2000), divididas em 15 subgêneros (Williams *et al* 2008). Na América do Sul são reconhecidas 21 espécies de *Bombus* de oito subgêneros e adaptadas a uma grande variedade de ambientes, desde o nível do mar até 4400 m de altitude nos Andes (Abrahamovich *et al* 2004).

No Brasil, ocorrem somente sete espécies, todas pertencentes ao subgênero *Thoracobombus* (Williams *et al* 2008): *B. morio* (Swederus 1787), *B. pauloensis* (também conhecida como *B. atratus* (Franklin, 1913)), *B. bellicosus* (Smith 1879), *B. brasiliensis* (Lepelletier, 1836), *B. brevivillus* (Franklin 1913), *B. transversalis* (Oliver 1789) (Williams *et al* 1998), e mais recentemente *B. applanatus* (Oliveira, Françaço & Arias, sp. nov.). Essa última foi descrita como uma nova espécie do gênero *Bombus* Latreille (1802) presente no nordeste brasileiro (Françaço *et al* 2016).

Todas as espécies de *Bombus* presentes no Brasil pertenciam ao subgênero *Fervidobombus*, entretanto, esse grupo mostrou-se parafilético por análises moleculares (Cameron *et al* 2007), ficando então denominado *Thoracobombus* (Williams *et al* 2008). Das sete espécies registradas no país, quatro são descritas com ocorrência no Rio Grande do Sul, incluindo: *B. morio*, *B. pauloensis*, *B. bellicosus* e *B. brasiliensis* (Moure & Sakagami 1962).

No entanto, de acordo com a última atualização do catálogo online de Abelhas Moure, *B. brasiliensis* está ausente (Moure & Melo 2012).

A redução populacional de algumas espécies de *Bombus* tem sido registrada na Grã-Bretanha e nos Estados Unidos (Goulson *et al* 2008), principalmente em decorrência da ação antrópica, como intensificação da agricultura e urbanização (Pywell *et al* 2006). Nesse sentido, a diminuição da diversidade de espécies de polinizadores pode se tornar um problema caso a polinização de uma determinada espécie de planta seja realizada por um polinizador específico.

O real entendimento dos fatores que influenciam na perda de polinizadores, assim como na efetividade da polinização (Allen-Wardell *et al* 1998, Kearns *et al* 1998), podem ser avaliadas a partir de observações de visitação e comportamento alimentar dos polinizadores em campo (Abrahamovich & Díaz 2001), permitindo estabelecer a relação entre os polinizadores e as plantas por eles exploradas.

A ocorrência de espécies de polinizadores, sua distribuição geográfica e o recurso floral visitado são fatores ecológicos importantes que relacionam esses organismos com os recursos do ambiente, além da manutenção da diversidade de espécies. Portanto, uma atualização sobre as espécies de *Bombus* encontradas no Estado do Rio Grande do Sul se faz necessária, visto que já houve registro de quatro espécies (Moure & Sakagami 1962) e na última atualização do Catálogo Online de Abelhas Moure há o registro de ocorrência de três espécies de *Bombus* (Moure & Melo 2012). Assim, o presente trabalho objetivou realizar um levantamento das espécies de *Bombus* e sua distribuição geográfica no Estado, bem como sua relação com as plantas hospedeiras e recursos florais.

MATERIAL E MÉTODOS

Locais amostrados

O levantamento e identificação das espécies de *Bombus* presentes no Rio Grande do Sul e sua associação floral, ocorreu em 48 municípios abrangendo várias regiões do Estado (Tabela 1). A escolha de alguns municípios foi de acordo com registros de ocorrência do polinizador no Estado, diferentes tipos de clima (clima Cfa com verões quentes e clima Cfb e Cw com temperatura quente no verão e inverno seco), de acordo com Alvares *et al* (2013) e altitudes, de forma a identificar quais variáveis ambientais influenciam no estabelecimento e sobrevivência de *Bombus* em diferentes áreas. Além disso, foram considerados os sistemas ecológicos do Rio Grande do Sul da ecorregião das Savanas Uruguaias (Hasenack *et al* 2010).

Coletas

As coletas foram realizadas na primavera e verão no período de 2017 a 2019, com rede entomológica (feita em alumínio resistente, cabo retrátil com 115 cm de comprimento quando aberto, cesta com 90 cm de profundidade e 40 cm de diâmetro). Quando necessário, utilizou-se cabos adaptadores para facilitar a coleta de *Bombus* em árvores de grande porte. As coletas foram realizadas mediante autorizações do SISBIO (número de autorização: 59495-2) e SisGen (número de cadastro: A452394).

Os *Bombus* foram coletados diretamente no recurso floral visitado durante o forrageamento. As plantas visitadas foram identificadas e classificadas em nativas, introduzidas e cultivadas, de acordo com informações registradas no site da Rede de Catálogos Polínicos – RCPol (<http://chaves.rcpol.org.br/eco?>) e Flora Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>).

Em cada ponto de coleta as coordenadas geográficas foram marcadas com auxílio de um GPS (Garmin) e a variável climática temperatura, considerada um fator abiótico

importante para o forrageamento das abelhas, também foi registrada. De acordo com Roubik (1989) as abelhas iniciam, aumentam ou diminuem o ritmo das atividades de forrageamento de acordo com as condições climáticas, principalmente de temperatura.

Nos municípios amostrados, foram realizadas observações nos recursos florais existentes e quando detectada a presença de *Bombus*, estes eram coletados e transferidos para frascos plásticos. Os espécimes foram transportados, no menor tempo possível, para o Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP), localizado na UFSM, identificados morfológicamente ao nível de espécie e transferidos para caixas entomológicas do laboratório.

Identificação das espécies

A identificação dos espécimes ocorreu por meio da chave taxonômica proposta por Moure & Sakagami (1962) e adaptada por Santos Júnior *et al* (2015), e descrições morfológicas fornecidas por Silveira *et al* (2002) e Françoso *et al* (2016). As espécies identificadas foram confirmadas de acordo com espécimes catalogados na Coleção de Abelhas do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCT), e rotuladas com etiquetas contendo informações relativas à localização da espécie de *Bombus*, data, hora, método de coleta e hospedeiro floral.

Análise dos dados

A análise da distribuição geográfica de *Bombus* spp. no Rio Grande do Sul considerou as variáveis de localização das espécies de *Bombus*, data de amostragem, sistema ecológico das Savanas Uruguaias, temperatura e recurso floral visitado por cada espécie.

Os dados foram agrupados para avaliar associações entre as espécies de *Bombus* e as localidades de ocorrência. As interpolações foram geradas no software ArcMap 10.5 (Esri 2011), por meio da ferramenta “Tabulate Intersection”, que gera interseção espacial com as tabelas de atributos das amostras. O método baseado na ponderação por distância foi utilizado para as análises que usam algoritmos de interpolação do tipo local, que são considerados

aproximados e determinísticos. O valor em uma dada coordenada é calculado por uma média ponderada dos valores das amostras vizinhas, e a ponderação mais comumente aplicada utiliza o inverso do quadrado da distância (IDW - Inverse Distance Weighting) (Huisman & De By 2009).

RESULTADOS

De acordo com o levantamento e identificação das espécies de *Bombus* coletadas no Rio Grande do Sul durante o período de 2017 a 2019, dos 48 municípios amostrados, 32 tiveram registro de ocorrência (Tabela 1). Embora não tenham sido encontradas em 16 dos municípios amostrados, verificou-se que as espécies de *Bombus* estão amplamente distribuídas no Estado ocupando diversos sistemas ecológicos.

Durante o período de amostragem, houve coleta de apenas duas espécies, *B. morio* e *B. pauloensis* de coloração amarela. Dos 32 municípios com ocorrência dos polinizadores, em 18 foram coletadas ambas as espécies, em nove apenas *B. morio* e em cinco apenas *B. pauloensis* (Tabela 1).

No total foram coletados 469 espécimes de *Bombus*, dos quais 330 de coloração inteiramente preta, identificados como *B. morio* e 139 com faixas amarelas intercaladas, identificados como *B. pauloensis*, demonstrando maior abundância de *B. morio* no Estado. Os espécimes coletados foram utilizados para identificação morfológica, os quais serviram para dar início à coleção entomológica de *Bombus* spp. do LabMIP da UFSM e para identificação molecular (outro trabalho de pesquisa) para confirmação da espécie.

Conforme a Figura 1A – a distribuição espacial de *Bombus* ocorreu em diferentes sistemas ecológicos presentes no Estado: B1 – Floresta Estacional, B2 – Campo Misto com Andropogêneas e Compostas, B3 – Campo com Barba-de-Bode, B4 – Campo Graminoso, B6 – Campo Arbustivo, B7 – Campo Litorâneo, B9 – Campo com Espinilho, B10 – Campos de

Solos Rasos e B11 – Outras formações. Foi verificado que ocorrem as duas espécies de *Bombus* no mesmo local ou apenas uma delas, levantando a hipótese de influência espacial da ocorrência desse polinizador nos diferentes sistemas ecológicos.

Na figura 1B, o mapa gerado pela interpolação IDW, representou a influência de cada espécie em sua ocorrência, onde para a execução deste método são atribuídos pesos a cada tipo de variável de acordo com a metodologia descrita por Huisman & De By (2009). Os pesos são dados segundo seu nível de significância, neste caso, foram atribuídos pesos em escala crescente conforme o número de ocorrências das espécies.

Foi atribuído o peso 1 para *B. pauloensis* (espécie com menos ocorrência individual), peso 2 para *B. morio* (espécie com maior ocorrência individual), e por fim peso 3 para a ocorrência simultânea das duas espécies (com maior número de indivíduos coletados). Foi observada maior influência das espécies *B. morio* e *B. pauloensis* ocorrerem juntas na metade sul do Estado, acredita-se ser pelas formações vegetacionais presentes nos campos da porção sul e oeste do Rio Grande do Sul. Essas formações possuem continuidade com os campos do Uruguai, apresentando uma flora diversificada e constituída por diversas espécies de gramíneas, compostas, ciperáceas e leguminosas, e muitas outras famílias com menor número de espécies (Hasenack *et al* 2010).

No Uruguai, estão presentes apenas duas espécies de *Bombus*, *B. pauloensis* (ou *B. atratus*, como também é conhecida) e *B. bellicosus*, que são comumente encontradas em diferentes regiões do país de outubro a março (Arbulo *et al* 2011). De acordo com Arbulo *et al* (2011), ambas espécies possuem língua longa podendo polinizar flores com corola profunda como o trevo vermelho, leguminosa produzida no Uruguai e que possui importante fonte de alimento para essas espécies de *Bombus* (Goulson 2003, Heinrich 2004, Michener 2007). Segundo Arbulo *et al* (2011), tanto *B. pauloensis* quanto *B. bellicosus* possuem língua

maior que 7 mm de comprimento, considerado suficiente para atingir o néctar do trevo vermelho (Holm 1966).

O maior número dos sistemas ecológicos das Savanas Uruguaias encontra-se na região Sul do Estado. Assim, se fez o cruzamento espacial dos sistemas ecológicos com a ocupação de *B. morio* e *B. pauloensis*, gerando um gráfico do percentual representativo da ocupação de cada espécie dentro de cada bioma e sua representatividade na formação de todo o sistema ecológico do estado, uma vez que, a soma de todos os biomas resultam na área do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1C).

A ocorrência das espécies de forma isolada e associadas se deu com maior representatividade somente nos sistemas ecológicos B3 e B11, os quais abrangem a parte norte do Estado, incluindo campos de cima da serra, planalto médio, encosta inferior e alto Uruguai, e parte das Missões. Nesses locais *B. pauloensis* teve a maior ocupação espacial de quase 18%. A maior ocupação espacial com ocorrência conjunta de *B. morio* e *B. pauloensis* foi verificada nos sistemas ecológicos B2, B3, B6 e B11.

Para entender melhor a influência de fatores abióticos sobre a distribuição de *Bombus* no Estado, foi avaliada a influência da temperatura no momento de coleta de cada espécie, sendo observado que a maior quantidade de *B. morio* (69%) foi encontrada no intervalo de temperatura de 20,5°C e 25,5°C, demonstrando que a atividade de forrageio dessa espécie é mais restrita quanto a temperatura, enquanto que *B. pauloensis* possui maior flexibilidade de forrageio, sendo coletada em diferentes faixas de temperatura (10,88–15,5°C; 15,5–20,5°C; 20,5–25,5°C; 25,5–28,5°C) (Gráfico 1), confirmando que apesar das espécies ocuparem sistemas ecológicos semelhantes, *B. pauloensis* é mais adaptável quanto a variação de temperatura.

É possível encontrar ambas as espécies nos mais diversos ambientes, agrícolas (plantação de tomate, feijão, abóbora) e não agrícolas (árvores com flores em áreas urbanas),

o que as tornam importantes para a polinização e a manutenção da biodiversidade, mas também ficam mais expostos aos agrotóxicos pulverizados nos ambientes agrícolas, podendo comprometer sua abundância e distribuição nos locais de ocorrência.

Tabela 1 Municípios do Rio Grande do Sul com coletas de *Bombus* spp. e data de amostragem.

Espécie	Municípios		Data
<i>Bombus morio</i>	Agudo	29°72'S 53°22'W	Set 2017
-	Silveira Martins	-	Fev 2018
<i>Bombus morio e</i>	Santa Maria	29°71'S 53°71'W	Set 2017
<i>Bombus pauloensis</i>			Out 2017
			Fev 2018
			Abr 2018
			Nov
			2018
			Mar
			2019
<i>Bombus morio e</i>	São Pedro do Sul	29°63'S 54°18'W	Out 2017
<i>Bombus pauloensis</i>			Nov
			2018
<i>Bombus morio e</i>	São Sepé	30°15'S 53°58'W	Out 2017
<i>Bombus pauloensis</i>			Mar
			2019
<i>Bombus morio e</i>	Caçapava do Sul	30°51'S 53°48'W	Out 2017
<i>Bombus pauloensis</i>			Fev 2018
			Mar
			2019
-	Vale Vêneto	-	Nov
			2017
-	São João do Polêsine	-	Nov
			2017
-	Faxinal do Soturno	-	Nov
			2017
-	Nova Palma	-	Nov
			2017
-	Ivorá	-	Nov
			2017
<i>Bombus pauloensis</i>	Cruz Alta	28°64'S 53°59'W	Nov
			2017
			Fev 2018
<i>Bombus morio e</i>	Júlio de Castilhos	29°25'S 53°66'W	Nov
<i>Bombus pauloensis</i>			2017
			Fev
			2018
			Mar
			2019

-	São Gabriel	-	Dez 2017
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Rosário do Sul	30°24'S 54°92'W	Dez 2017
-	Alegrete	-	Dez 2017
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Itaara	29°54'S 53°75'W	Dez 2017
-	-	-	Fev 2018
-	-	-	Mar 2019
-	Ibirubá	-	Dez 2017
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Selbach	28°63'S 52°95'W	Dez 2017
-	Erechim	-	Jan 2018
<i>Bombus pauloensis</i>	Sertão	28°03'S 52°27'W	Dez 2017
-	Getúlio Vargas	-	Dez 2017
-	Floriano Peixoto	-	Dez 2017
<i>Bombus pauloensis</i>	Três Passos	27°45'S 53°93'W	Jan 2018
<i>Bombus pauloensis</i>	Frederico Westphalen	27°39'S 53°42'W	Jan 2018
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Três Arroios	27°54'S 52°20'W	Jan 2018
<i>Bombus pauloensis</i>	Vacaria	28°52'S 50° 95'W	Jan 2018
<i>Bombu morios e Bombus pauloensis</i>	Caxias do Sul	29°12'S 51°19'W	Jan 2018
<i>Bombus morio</i>	Lajeado	29°45'S 52°03'W	Jan 2018
-	Canguçu	-	Fev 2018
<i>Bombus morio</i>	Pelotas	31°74'S 53°33'W	Fev 2018
<i>Bombus morio</i>	Santa Cruz do Sul	29°71'S 52°43'W	Fev 2018
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Lavras do Sul	30°81'S 53°89'W	Fev 2018
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Bagé	31°28'S 54°12'W	Fev 2018
-	Aceguá	-	Fev 2018
<i>Bombus morio</i>	Dom Pedrito	30°98'S 54°67'W	Fev 2018
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Santana do Livramento	30°89'S 55°53'W	Fev 2018
<i>Bombus morio</i>	Santiago	29°20'S 54°85'W	Fev 2018
<i>Bombus pauloensis</i>	-	-	Abr 2019
-	São Vicente do Sul	-	Fev 2018
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Porto Alegre	30°02'S 51°20'W	Abr 2018
<i>Bombus morio e Bombus pauloensis</i>	Ijuí	28°44'S 53°87'W	Abr 2018

-	Santo Ângelo	-	Abr 2018
<i>Bombus morio</i>	São Luiz Gonzaga	28°40'S 54°96'W	Abr 2018
<i>Bombus morio e</i>	São Borja	28°67'S 55°97'W	Abr 2018
<i>Bombus pauloensis</i>			
<i>Bombus morio</i>	Restinga Seca	29°81'S 53°36'W	Out 2018
<i>Bombus morio</i>	Paraíso do Sul	29°73'S 53°17'W	Nov 2018
			2018
<i>Bombus morio e</i>	Capão do Cipó	28°92'S 54°55'W	Abr 2019
<i>Bombus pauloensis</i>			
<i>Bombus morio</i>	Santa Rosa	27°90'S 54,47'W	Abr 2019

- indica que não houve coleta de *Bombus* spp.

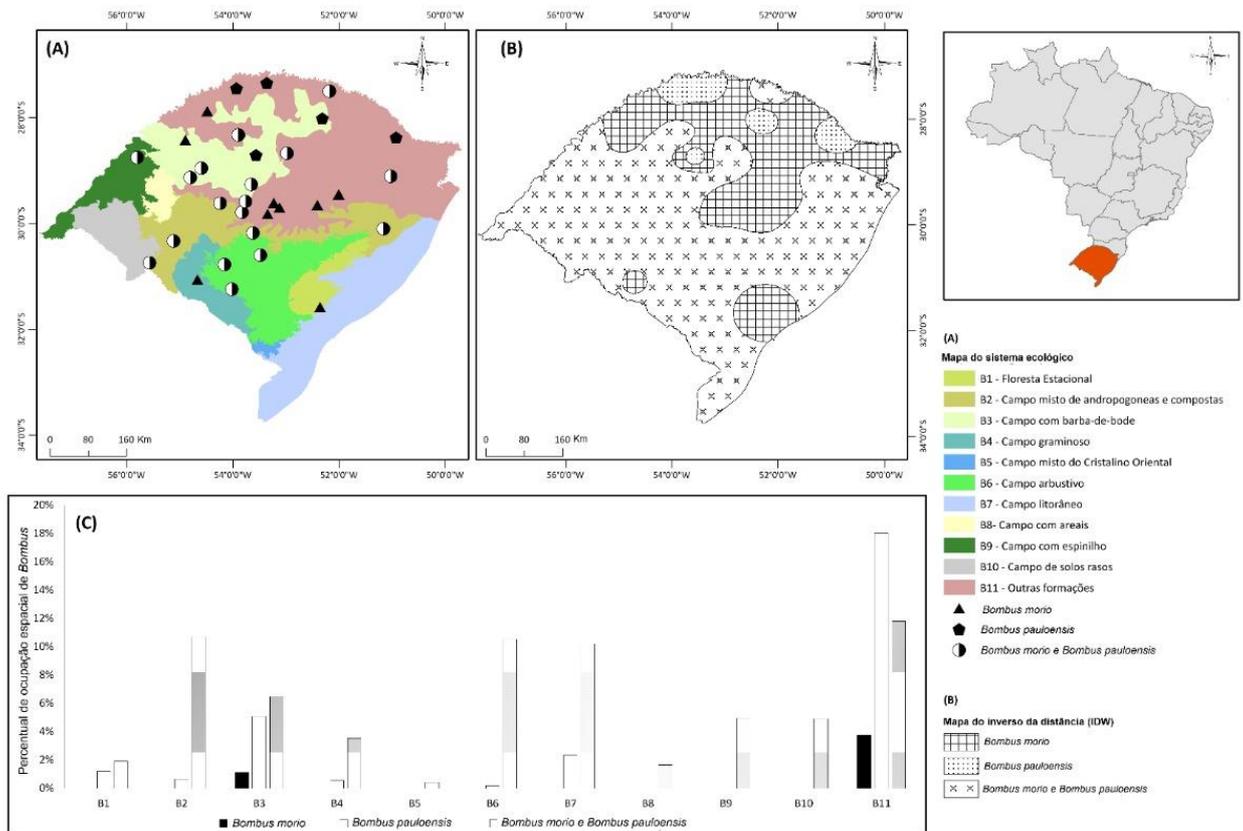


Figura 1 A – Distribuição espacial de *B. morio* e *B. pauloensis* sobre os sistemas ecológicos do Rio Grande do sul; B – Influência de cada espécie no espaço e probabilidade de ocorrência de *Bombus* no Estado por meio do sistema de interpolação IDW; C – Representatividade espacial da ocorrência das espécies de *Bombus* de acordo com o sistema ecológico.

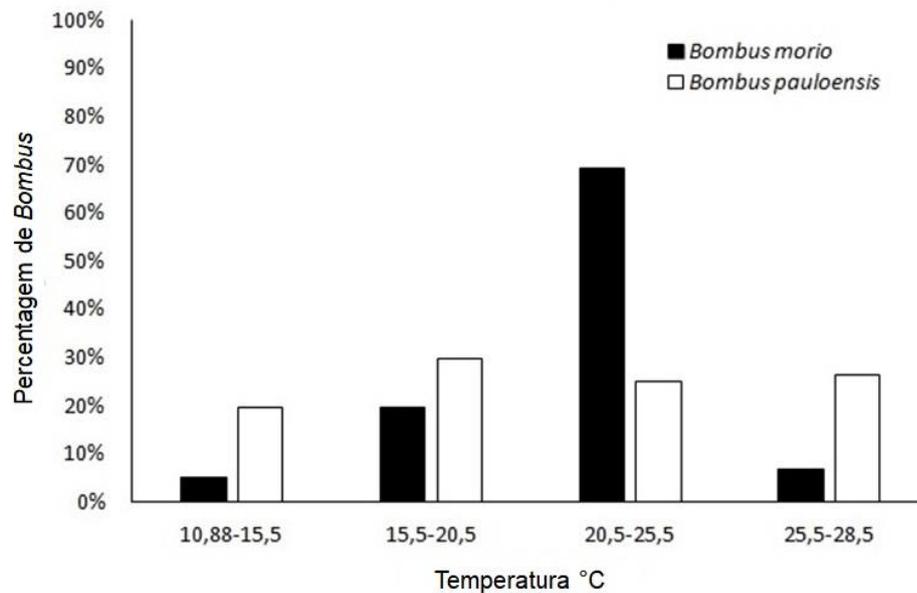


Gráfico 1 Percentual de espécie de *B. morio* e *B. pauloensis* de acordo com intervalos de temperatura.

Informações sobre as espécies

1 - *Bombus morio*

Espécie com pilosidade inteiramente preta, área malar mais longa que larga na base da mandíbula e área do mesoscuto sem brilho. No início da primavera (setembro e outubro) as rainhas saem em busca de locais para construir seus ninhos e coletar alimento. Portanto, praticamente não se observa o forrageio de operárias nesse período. A partir de novembro é observado mais atividade forrageira de operárias em campo e menos da rainha. Os ninhos geralmente são construídos no solo e cobertos com restos vegetais.

Distribuição:

Distribui-se amplamente no Rio Grande do Sul, sendo encontrada em grande parte dos municípios amostrados, visitando recursos florais em áreas de vegetação nativa, introduzida e plantas cultivadas, demonstrando ser um polinizador generalista e importante para o

ecossistema. *B. morio* teve ocorrência em 27 dos 32 municípios em que foi detectada a presença de *Bombus* (Tabela 1).

Flora associada:

No Rio Grande do Sul, *B. morio* foi coletado visitando recursos florais de 14 espécies de plantas (09 nativas, 04 introduzidas e 01 cultivada) pertencentes a 09 famílias (Tabela 2).

2 - *Bombus pauloensis*

Todos os indivíduos dessa espécie coletados nessa pesquisa possuíam três faixas amarelas intercaladas com a coloração preta, cobrindo apenas a parte dorsal. E igualmente como ocorre para *B. morio*, *B. pauloensis* surge no início da primavera (setembro e outubro) quando as rainhas saem em busca de locais para construir seus ninhos e coletar alimento. Portanto, praticamente não se observou forrageio de operárias nesse período.

A partir de novembro é observada maior atividade forrageira de operárias em campo e menos de rainha. Os ninhos geralmente estavam construídos no solo e cobertos com restos vegetais. Durante as coletas de espécies de *Bombus*, um ninho superativo de *B. pauloensis* foi encontrado no município de São Sepé. O mesmo foi observado até o final do outono, mantendo sua atividade, no entanto após o inverno chuvoso e frio ocorrido no Estado em 2018, o ninho não foi mais encontrado quando se iniciou a primavera.

Distribuição:

Distribui-se amplamente no Rio Grande do Sul, sendo encontrado em grande parte dos municípios amostrados, visitando recursos florais em áreas de vegetação nativa, introduzida e plantas cultivadas, também demonstrando ser um polinizador generalista e importante para o ecossistema. *B. pauloensis* teve ocorrência em 23 dos 32 municípios em que foi detectada a presença de *Bombus* (Tabela 1).

Flora associada:

No Rio Grande do Sul, *B. pauloensis* foi coletado visitando recursos florais de 11 espécies de plantas (05 nativas, 04 introduzidas e 02 cultivadas), pertencentes a 08 famílias (Tabela 2).

Interações planta-polinizador

O conjunto de dados dos visitantes florais em 14 meses de coletas foi compreendido de 17 espécies de plantas visitadas, caracterizadas por 11 famílias e 02 espécies de *Bombus* (*B. morio* e *B. pauloensis*). Foram 06 famílias visitadas por ambas as espécies, indicando o hábito generalista do polinizador (Tabela 2). Em nível de espécie, *B. morio* teve mais interações (14) no geral, e maior amplitude floral, com 05 interações únicas, enquanto que *B. pauloensis* teve interações com 12 espécies de plantas, das quais 03 foram interações únicas.

Embora *B. morio* se sobressaia em número de interações, a pesquisa revela que ambas as espécies são generalistas e estavam presentes em todos os períodos de amostragem. A visitação de *B. morio* e *B. pauloensis* nos recursos florais não impediu a ocorrência de outros polinizadores (diversos gêneros de abelhas, borboletas, mariposas e beija-flores), indicando sua convivência harmônica com os demais, sem monopolizar as áreas.

Tabela 2 Espécies de *Bombus* presentes no Rio Grande do Sul (*Bombus morio*, B. m. e *Bombus pauloensis*, B. p.) e flora associada, agrupada de acordo com a família (Consulta das famílias e tipos de plantas: RCPol e Flora do Brasil 2020).

Espécies de plantas associada	Tipo de planta*	Espécie de <i>Bombus</i>	
		<i>B. m.</i>	<i>B. p.</i>
Apocynaceae			
<i>Allamanda catártica</i>	Nativa	+	
<i>Allamanda blanchetti</i>	Nativa	+	
Fabaceae			
<i>Caesalpinia peltophoroides</i>	Nativa	+	+
<i>Senna macranthera</i>	Nativa	+	+
<i>Phaseolus vulgari</i>	Nativa		+
Bignoniaceae			
<i>Jacaranda brasiliana</i>	Nativa	+	+
Lythraceae			

<i>Lagerstroemia indica</i>	Introduzida	+	+
<i>Handroanthus chrysotrichus</i>	Nativa	+	+
Malvaceae			
<i>Hibiscus syriacus</i>	Introduzida	+	+
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Introduzida	+	
<i>Ceiba speciosa</i>	Nativa	+	+
Cucurbitaceae			
<i>Cucurbita pepo</i>	Cultivada	+	+
Melastomataceae			
<i>Tibouchina granulosa</i>	Nativa	+	
Asteraceae			
<i>Dahlia pinnata</i>	Introduzida	+	+
Rhamnaceae			
<i>Ziziphus joazeiro</i>	Nativa	+	
Solanaceae			
<i>Solanum lycopersicum</i>	Cultivada		+
Verbenaceae			
<i>Duranta erecta</i>	Introduzida		+

*Nativa, introduzida e cultivada no Brasil

DISCUSSÃO

De acordo com o banco de dados da Coleção de Abelhas do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCT), referente às coletas realizadas com diferentes metodologias no período de 1967 a 2018, em 39 municípios do Rio Grande do Sul foi registrada a ocorrência de quatro espécies de *Bombus*.

Segundo as informações contidas nesse banco de dados, a espécie com maior representatividade foi *B. pauloensis* (451 espécimes), seguida de *B. morio* (191 espécimes), *B. bellicosus* (119 espécimes) e *B. brasiliensis* (09 espécimes). O último registro de *B. bellicosus* foi em 2011, com apenas um espécime de rainha coletado no município de Esmeralda. A espécie *B. brasiliensis* teve seu último registro em 2000 no município de São Francisco de Paula, também com apenas um espécime coletado, sem identificação de sexo.

As espécies *B. morio* e *B. pauloensis* são consideradas as mais abundantes no Estado e as áreas ocupadas por elas se sobrepõem. Ambas mostram correspondência com a distribuição das florestas tropicais e subtropicais, bem como dos campos moderadamente secos (Moure & Sakagami 1962). No entanto, durante o período da pesquisa a espécie *B.*

morio teve maior representatividade (330 espécimes), quando comparada à espécie *B. pauloensis* de coloração amarela (139 espécimes), distribuídas em diversas regiões do Estado, ocupando áreas semelhantes de clima e vegetação.

Em alguns dos municípios amostrados não foram encontrados espécimes de *Bombus* e novos estudos podem comprovar a ausência ou registrar a ocorrência. Essa condição pode estar relacionada à capacidade que um organismo tem de habitar determinado ambiente, influenciado por fatores abióticos (temperatura, umidade, radiação solar, precipitação, entre outros) e por interações bióticas (outros animais, alimento – recursos florais para as abelhas, doenças, etc.).

Os sistemas ecológicos que formam o Rio Grande do Sul fazem parte dos dois biomas que compõem o Estado, a Mata Atlântica e o Pampa. A formação dos dois biomas ocorre em função da diversidade de clima, solos e relevo. O domínio do bioma Mata Atlântica, definido pela presença predominante de vegetação florestal, se estende por cerca de 37% do território gaúcho, ocupando a metade norte do estado, embora atualmente restem somente 7,5% de áreas remanescentes com alto grau de fragmentação em relação a cobertura vegetal original (Atlas Socioeconômico do RS 2020). A Mata Atlântica possui uma imensa diversidade de espécies vegetais, com predominância das famílias Asteraceae e Poaceae (Boldrini 2009).

Já o Bioma Pampa, cuja ocorrência no Brasil é restrita ao Rio Grande do Sul, ocupa a metade sul do estado se estendendo por 63% do território gaúcho. Define-se por um conjunto de vegetação de campo em relevo predominante de planície que se estende também pelo Uruguai e Argentina e é marcado pela presença de grande diversidade de fauna e flora ainda pouco conhecida. É considerado atualmente o segundo bioma mais ameaçado do país, atrás apenas do bioma Mata Atlântica (Atlas Socioeconômico do RS 2020).

A área do Estado divide-se em 13 sistemas ecológicos das Savanas Uruguaias, que compreende campos com diferentes formações vegetacionais em diferentes graus de

conservação e uso (Hasenack *et al* 2010). Nesse sentido, a vegetação do Estado abriga uma alta biodiversidade de organismos, em especial, os polinizadores, que utilizam os recursos florais disponíveis para alimentação, sejam de espécies nativas, introduzidas ou cultivadas.

Foi observado maior número de indivíduos de ambas as espécies de *Bombus* ocupando a parte sul do Estado, o que pode ser justificado por ter maior diversidade de espécies vegetais e locais propícios para a construção de ninhos. No Campo com Barba-de-Bode pode-se encontrar *Borreria poaya* de flores azuis, *Staelia thymoides* de flores brancas (Rubiaceae), *Stylosanthes leiocarpa* (Fabaceae), *Melochia chamaedrys* de flores amarelas (Malvaceae), *Glandularia peruviana* (Verbenaceae) e *Waltheria douradinha* (Malvaceae).

No campo arbustivo destacam-se as leguminosas *Lathyrus pubescens*, *Rhynchosia diversifolia*, *Clitoria nana*, *Adesmia punctata*, *A. incana*, *Galactia neesii* e *Eriosema tacuareboense*. Seus campos são também ricos em arbustos, como por exemplo, *Mimosa ramulosa*, *Eupatorium buniifolium*, *Baccharis dracunculifolia*, *B. articulata*, *B. pentodonta*, *B. riograndensis*, *B. rufescens*, *Heterothalamus allienus*, *Dodonea viscosa*, *Scoparia ericacea*, além de várias espécies de *Croton* e *Eryngium horridum* (Hasenack *et al* 2010).

Em muitas dessas famílias de plantas, como Fabaceae, Malvaceae e Verbenaceae, foram coletadas espécies de *Bombus* visitando seus recursos florais. Outro aspecto que pode ter interferido na maior ocorrência de *Bombus* na metade Sul do Estado, pode ser o tipo de vegetação local predominante, com mais áreas de vegetação nativa na parte sul, quando comparado a áreas com maior produção de grãos na parte norte do Estado.

As condições climáticas junto com a disponibilidade de recursos florais constituem fatores determinantes para a manutenção da população de *B. morio* e *B. pauloensis*, assim como influenciam na presença ou ausência dessas espécies em uma região. Ambientes com maior diversidade de plantas com flores resultam em elevada população das espécies de *Bombus* e lugares pouco antropizados fornecem locais mais seguros para construção de

ninhos, visto que são construídos no solo. Ambos ambientes são importantes para a manutenção dessas espécies.

Na Europa, descobriu-se que a riqueza de espécies de *Bombus* tende a ser particularmente alta em locais ricos em flores (Goulson 2010). De acordo com McMenamin *et al* (2016), as abelhas habitam uma variedade de ambientes, incluindo paisagens selvagens, agrícolas e urbanas. Nesses ambientes diversificados, vários fatores bióticos e abióticos, incluindo a ação de patógenos, disponibilidade de nutrientes, exposição a agrotóxicos e o microbioma, convergem para afetar a saúde das abelhas, contribuindo para sua perda.

Apesar da distribuição de *B. morio* ser semelhante à de *B. pauloensis*, foi encontrada maior abundância de *B. morio* no Estado, que pode ser justificado pela maior capacidade de adaptação ou até mesmo pela rusticidade da espécie mais abundante. Segundo Hall *et al* (1997) a qualidade do habitat (capacidade do ambiente de fornecer condições adequadas para a persistência individual e populacional) é determinante para a sobrevivência e continuidade de uma espécie. Em um habitat com baixa qualidade, uma espécie pode declinar, diminuir sua abundância, ou ter problemas para reproduzir-se (Mortelliti *et al* 2010).

Nos municípios em que foi constatada a presença de *B. morio* e/ou *B. pauloensis*, os fatores abióticos que influenciaram a dinâmica populacional foram a temperatura, que estava entre 10,88°C e 28,50°C, a umidade relativa do ar entre 39,12 e 96,15%, a radiação entre 1,81 e 2.894,13 KJ/m² e a altitude que foi desde o nível do mar (Praia do Laranjal em Pelotas), até 971m no município de Vacaria.

Segundo Gary (1967) e Heinrich (1979), abelhas sociais maiores (com maior biomassa corporal), como *Bombus* spp. e *Apis mellifera* Linnaeus, podem iniciar a atividade de forrageio em temperaturas menores, por vezes, abaixo de 10°C. Embora associados à temperatura do ar, os valores ótimos de umidade relativa para o forrageio de abelhas situam-se entre 30% e 70% na maioria das espécies (Kleinert-Giovannini & Imperatriz-Fonseca

1986, Hilário *et al* 2001). Outra variável importante é o horário de forrageamento ao longo do dia, onde foi observada atividade forrageira mais intensa das 8:00 h até as 11:00 h. No entanto, ambas as espécies podem ser encontradas até as 18:00 h no período do verão, porém em pequena quantidade.

É importante destacar que as condições de radiação solar foi um fator importante nas amostragens, visto que em condições do dia com nebulosidade, praticamente não foi visualizado espécimes de *Bombus* forrageando, como observado no município de Itaara, em uma localidade com abundância de recurso floral, os polinizadores só iniciaram atividade intensa de forrageio quando a radiação se elevou. Para diversas espécies de abelhas, alguns autores (Oliveira 1973, Kleinert-Giovannini 1982, Kleinert-Giovannini & Imperatriz-Fonseca 1986) registraram menor atividade de voo em dias nublados quando comparados com dias ensolarados nas mesmas temperaturas.

Para Hilário *et al* (2000), Vicens & Bosch (2000) e Kleinert (2009), os fatores abióticos que mais afetam o voo das abelhas são a temperatura, a intensidade luminosa, a umidade relativa do ar e a velocidade do vento. Durante as coletas de *Bombus* no Rio Grande do Sul foi verificado que a capacidade de voo e atividade de forrageamento de *B. morio* e *B. pauloensis* com rajadas de vento até 11,2 m/s não foi prejudicada.

Ventos com velocidade entre 2 m/s e 3 m/s provocam decréscimo no número de operárias de *Plebeia emerina* (Friese) (uma espécie de abelha de pequeno porte) que deixam os ninhos, levando inclusive à interrupção do forrageio quando atingem 4 m/s (Kleinert-Giovannini 1982). Nessas mesmas condições, operárias de *Tetragonisca angustula* (Latreille) continuam a coletar alimento normalmente (Iwama 1977), enquanto outras espécies, como *Plebeia droryana* (Friese), *Plebeia saiqui* (Friese) e *Melipona marginata* (Lepeletier) são apenas ligeiramente afetadas (Oliveira 1973, Kleinert-Giovannini & Imperatriz-Fonseca 1986).

Temperaturas extremas, muito quentes ou muito frias, restringem a atividade de voo das abelhas. O limite mínimo observado para a atividade de voo de *M. bicolor bicolor* foi de 11°C, com temperaturas ótimas entre 17°C e 22°C (Hilário *et al* 2000). Para as espécies de *Bombus* encontradas no Estado, em horários do dia com temperatura mais alta (acima de 28,5°C), assim como, em dias muito frios (abaixo de 10,88°C) não foi observada atividade de forrageio (Gráfico 1).

Normalmente os himenópteros voadores desidratam ou aumentam a temperatura do corpo próximo a níveis letais quando a umidade relativa é muito baixa ou sob condições muito altas de temperatura, respectivamente (Kasper *et al* 2008). A intensidade da luz atua principalmente no auxílio à navegação visual das abelhas, desde a orientação até os recursos florais (Hilário *et al* 2000). Em baixas temperaturas ambientais, a intensidade da luz é também importante para manter seu calor corporal (Kovac *et al* 2009, Kovac & Stabentheiner 2011, Hartfelder *et al* 2013).

Em relação aos fatores bióticos, a riqueza de recursos florais foi um fator importante e condicionou a quantidade de *Bombus* que ocorreram nesses locais, além de ser determinante para a permanência destes nos ambientes (por exemplo, no município de Aceguá praticamente não havia recursos florais, e com isso nenhum espécime de *Bombus* foi observado). Foi constatado que alguns recursos florais são considerados atrativos para *Bombus*: *Jacaranda brasiliana*, *Handroanthus chrysotrichus*, *Caesalpinia peltophoroides* e *Senna macranthera*; pois esse polinizador foi observado com frequência em locais que existiam essas plantas.

Outra característica importante das espécies *B. morio* e *B. pauloensis* é o fato de conviverem em harmonia com outros polinizadores, não sendo fator limitante para sua ocorrência em determinada região. Assim como também não foi observado à influência de patógenos associados a essas espécies durante o período da pesquisa, e todos os exemplares coletados estavam superativos no forrageamento.

De acordo com Polatto & Alves (2008), para os recursos florais de *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) K. Schum., foi registrada interação planta-polinizador de 38 espécies de visitantes florais (abelhas, formigas, borboletas, mariposas, vespas, beija-flores e moscas) associados a esta planta, confirmando que alguns polinizadores conseguem conviver em harmonia com outros, tornando mais eficiente o processo de polinização por eles prestados.

No entanto, apesar da indiscutível importância desses polinizadores para a reprodução de grande parte de plantas com flores, apenas duas espécies de *Bombus* (*B. morio* e *B. pauloensis*) foram encontradas no Estado durante o período da pesquisa, sendo possível inferir que a principal causa do desaparecimento de espécies de abelhas do gênero *Bombus* no Rio Grande do Sul, esteja associada às ações antrópicas como, a fragmentação de habitats, grandes áreas de monocultura (principalmente a soja), desmatamento para a intensificação da agricultura e formação de novos campos para a pastagem, que além de reduzir os locais propícios à nidificação dessas espécies, uma vez que, em condições normais, constroem seus ninhos exclusivamente no chão, diminuem os recursos florais utilizados como alimento (pólen e néctar) tornando importante a manutenção desses ambientes para que seja possível preservar as espécies de *Bombus* no Estado.

Contribuição dos autores

JGS (autora principal), MB, JGS e LA coletaram material em campo; RF confecção dos mapas e gráficos; JGS (autora principal) redigiu o manuscrito; JGS (autora principal), CRP revisão crítica do manuscrito; e JVCG a concepção, planejamento e provisão das condições para a execução do projeto, além da revisão final do manuscrito.

Agradecimentos

A Professora Dra. Betina Blochtein, curadora da Coleção de Abelhas do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (MCT), por permitir a visita à coleção e por ceder informações sobre os registros de *Bombus*.

REFERÊNCIAS

- Abrahamovich AH, Díaz N (2001) Distribución geográfica de las especies del género *Bombus* Latreille (Hymenoptera, Apidae) em Argentina. *Revista Brasileira de Entomologia* 45 (1): 23-26
- Abrahamovich AH, Diaz NB, Morrone JJ (2004) Distributional patterns of the Neotropical and Andean species of the genus *Bombus* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Zoológica Mexicana* 20: 99-117
- Allen-Wardell G, Bernhardt P, Bitner R, Burquez A, Buchmann S, Cane J, Allen-Cox P, Dalton V, Santa Cruz C, Feinsinger P, Ingram M, Inouye D, Jones EC, Kennedy K, Kevan P, Koopowitz H, Medellín R, Medellín-Morales S, Nabhan GP (1998) The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology* 12:8-17
- Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, De Moraes Goncalves JL, Sparovek G (2013) Köppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift* 22 (6): 711-728
- Arbulo N, Santos E, Salvarrey SY, Invernizzi C (2011) Proboscis length and resource utilization in two Uruguayan bumblebees: *Bombus atratus* Franklin and *Bombus bellicosus* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Neotropical Entomology* 40: 72-77
- Atlas socioeconômico do RS. <https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/biomas>. 5° edição. Data de atualização: julho de 2020
- Boldrini II (2009) A flora dos Campos do Rio Grande do Sul. In *Campos Sulinos, conservação e uso sustentável da biodiversidade* (V.P. Pillar, S.C. Müller, & Z.M.S. de Castilhos, eds). Ministério do Meio Ambiente, Brasília, p 63-77
- Cameron SA, Hines HM, Williams, PHA (2007) Comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 161-188
- Esri (2011) ArcGIS Desktop: Release 10. Environmental Systems Research Institute, Redlands
- Françoso E, Oliveira FF, Arias CM (2016) An integrative approach identifies a new species of bumblebee (Hymenoptera: Apidae: Bombini) from northeastern Brazil. *Apidologie* 47: 171-185

- Gary, NE (1967) Diurnal Variations in the Intensity of Flight Activity from Honeybee Colonies. *Journal of Apicultural Research* 6: 65-68
- Giannini TC, Boff S, Cordeiro G D, Cartolano Jr EA, Veiga AK, Imperatriz-Fonseca VL, Saraiva AM (2015) Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie* 46: 209-223
- Goulson D (2003) *Bumblebees: their behaviour and ecology*. Oxford: Oxford University Press
- Goulson D, Lye GC, Darvill B (2008) Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology* 53: 191-208
- Goulson D (2010) *Bumblebees: behaviour, ecology and conservation*. Second Edition. Oxford University Press, USA, p 317
- Hall LS, Krausman PR, Morrison ML (1997) The habitat concept and a plea for standard terminology. *Wildlife Society Bulletin* 25: 173-182
- Hartfelder K (2013) Standard methods for physiology and biochemistry research in *Apis mellifera*. In: Dietemann V, Ellis JD, Neumann P (eds) *The coloss beebook, vol. I: standard methods for Apis mellifera research*. *Journal of Apicultural Research* 52: 26-31
- Hasenack H, Weber E, Boldrini II, Trevisan R (2010) Mapa de sistemas ecológicos da ecorregião das Savanas Uruguaias em escala 1:500.000 ou superior e relatório técnico descrevendo insumos utilizados e metodologia de elaboração do mapa de sistemas ecológicos. Porto Alegre: UFRGS
- Heinrich B (1979) Thermoregulation of African and European honeybees during foraging, attack, and hive exits and returns. *Journal of Experimental Biology* 80:217-229
- Heinrich B (2004) *Bumblebee economics*. Cambridge: Harvard University Press
- Hilário SD, Imperatriz-Fonseca VL, Kleinert AMP (2000) Flight Activity and Colony Strength in the Stingless bee *Melipona Bicolor Bicolor* (Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Biologia* 60: 299-306
- Hilário SD, Imperatriz-Fonseca VL, Kleinert AMP (2001) Responses to climatic factors by foragers of *Plebeia pugnax* Moure (in litt.) (Apidae, Meliponinae). *Revista Brasileira de Biologia, São Carlos*, 61 (2): 191-196
- Holm N (1966) The utilization and management of bumble bees for red clover and alfalfa seed production. *Annual Review of Entomology* 11: 155-186
- Huisman O, De By RA (2009) *Principles of Geographic Information Systems*. The International Institute for geo-Information Science and Earth Observation - ITC, Paises Baixos, p 540

- Iwama S (1977) Coleta de alimentos e qualidade do mel de *Tetragonisca angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, p 134
- Kasper ML, Reeson AF, Mackay DA, Austin AD (2008) Environmental factors influencing daily foraging activity of *vespula germanica* (Hymenoptera, Vespidae) in mediterranean Australia. *Insectes Sociaux* 55: 288-295
- Kearns CA, Inouye DW, Waser NM (1998) Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112
- Klein D, Raemakers IA (2008) Retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology* 89: 1811-1823
- Kleinert-Giovannini A (1982) The influence of climatic factors on flight activity of *Plebeia emerina* (Hym., Apidae, Meliponinae) in winter. *Revista Brasileira de Entomologia, Curitiba*, 26: 1-13
- Kleinert-Giovannini A, Imperatriz-Fonseca VL (1986) Flight activity and climatic conditions: responses by two subspecies of *Melipona marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae). *Journal of Apicultural Research, Cardiff*, 25: 3-8
- Kleinert AMP (2009) Abelhas Sociais (Bombini, Apini, Meliponini). In: Panizzi AR, Parra JRP (eds) *Bioecologia e Nutrição de Insetos: Base Para o Manejo Integrado de Pragas*. Embrapa Informação Tecnológica p 371-424
- Kovac H, Stabentheiner A, Schmaranzer S (2009) Thermoregulation of water foraging wasps (*Vespula Vulgaris* and *Polistes Dominulus*). *Journal of Insect Physiology* 55: 959-966
- Kovac H, Stabentheiner A (2011) Thermoregulation of foraging honeybees on flowering plants: Seasonal variability and influence of radiative heat gain. *Ecological Entomology* 36: 686-699
- McMenamin AJ, Brutscher LM, Glenny W, Flenniken ML (2016) Abiotic and biotic factors affecting the replication and pathogenicity of bee viruses. *ScienceDirect* 16: 14-21
- Michener CD (2000) *The bees of the world*. Baltimore: Johns Hopkins University Press
- Michener CD (2007) *The bees of the world*, second edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, p 807
- Mortelliti A, Amori G, Boitani L (2010) The role of habitat quality in fragmented landscapes: a conceptual overview and prospectus for future research. *Oecologia* 163 (2): 535-547
- Moure JS, Melo GAR (2012) Bombini Latreille, 1802. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). *Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version*. <http://www.moure.cria.org.br/catalogue/Acesso em 22 out 2018>
- Moure JS, Sakagami SF (1962) As mamangabas sociais do Brasil (*Bombus* Latr.) (Hymenoptera, Apoidea). *Studia Entomologica* 5 (1-4): 65-194

Oliveira MAC (1973) Algumas observações sobre a atividade externa de *Plebeia saiqui* e *Plebeia droryana*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, p 79

Polatto LP, Alves-JR VV (2008) Utilização dos recursos florais pelos visitantes em *Sparattosperma leucanthum* (Vell.) K. Schum. (Bignoniaceae). Neotropical Entomology 37 (4): 389-398

Pywell RF, Warman EA, Hulmes L, Hulmes S, Nuttall P, Sparks TH, Critchley CNR, Sherwood R (2006) Effectiveness of new agri-environment schemes in providing foraging resources for bumble bees in intensively farmed landscapes. Biol. Conserv 129: 192-206

Roubik DW (1989) Ecology and natural history of tropical bees. Cambridge: Tropical Biology Series, 1989. p 514

Santos Júnior JE, Santos FR, Silveira FA (2015) Hitting an Unintended Target: Phylogeography of *Bombus brasiliensis* Lepeletier, 1836 and the First New Brazilian Bumblebee Species in a Century (Hymenoptera: Apidae). PLoS One 10 (5) e0125847. doi:10.1371/journal.pone.0125847

Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB (2002) ABELHAS BRASILEIRAS: Sistemática e Identificação. 1ª edição Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, p 253

Vicens N, **Identificação. 1ª edição Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, p 253** Bosch J (2000) Weather-dependent pollinator activity in an apple orchard, with special reference to *Osmia Cornuta* and *Apis Mellifera* (Hymenoptera: Megachilidae and Apidae). Environmental Entomology 29: 413-420

Williams PH, Cameron SA, Hines HM, Cederberg B, Rasmont P (2008) A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). Apidologie 39 (1): 46-74

5 ARTIGO 2

Submetido a Neotropical Entomology (NENT-D-19-00313)

Ecologia, Comportamento e Bionomia

Identificação da Flora Utilizada por *Bombus morio* (Swederus, 1787) e *Bombus pauloensis* (Friese, 1913) (Hymenoptera: Apidae) por meio da Análise Palinológica de Cargas de Pólen Corbicular

JG SILVA¹, M BECHE¹, SG BAUERMANN², JN RADAESKI², CI SILVA³, JVC GUEDES¹

¹Departamento de Proteção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Rio Grande do Sul

³Departamento de Ecologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo

RESUMO

Interações planta-polinizadores são relações que envolvem na maioria das vezes ganhos para ambos os organismos. Os polinizadores coletam recursos alimentares (principalmente pólen e néctar), e suas atividades favorecem a reprodução das plantas. Neste estudo, por meio de observação indireta, foi avaliado o uso das plantas para a coleta de recursos florais por *Bombus (Thoracobombus) morio* Swederus (1787) e *Bombus (Thoracobombus) pauloensis* Franklin (1913), por meio da análise palinológica de cargas de pólen corbicular de indivíduos amostrados enquanto forrageavam em flores. O estudo possibilitou a identificação das espécies vegetais visitadas e também polinizadas por *B. morio* e *B. pauloensis* durante o forrageio. As coletas das abelhas nas flores foram feitas durante a primavera e verão de 2017 a 2018. Com a análise polínica, foi possível identificar a origem botânica dos recursos florais e verificado que na maioria das vezes os grãos de pólen predominantes não condiziam com a espécie de planta na qual o *Bombus* foi amostrado. A espécie *B. morio* foi amostrada em flores de 10 espécies de plantas e por meio da análise palinológica, identificado 52 tipos polínicos, enquanto que na espécie *B. pauloensis*, amostrada em flores de seis espécies de plantas, foram identificados 38 tipos polínicos. O recurso floral mais visitado por *B. morio* foi *Jacaranda brasiliana* e por *B. pauloensis*, *Senna macranthera*, no entanto, o tipo polínico encontrado em maior quantidade nas amostras de pólen para ambas as espécies foi de *Solanum* sp., permitindo inferir que essa planta é a mais atrativa. No total foram identificadas 11 espécies de plantas visitadas e 55 tipos polínicos associados à essas duas espécies de *Bombus* no Rio Grande do Sul, representados principalmente por plantas nativas (98%).

Palavras-chave: *Bombus*, comportamento de forrageamento, polinização, palinologia

INTRODUÇÃO

Abelhas do gênero *Bombus* são importantes polinizadores em áreas nativas e cultivadas, dependendo do pólen e do néctar de uma grande variedade de plantas (Abrahamovich & Díaz 2001, Morales & Aizen 2004, Smith-Ramírez *et al* 2005). Esses polinizadores tem a capacidade de se adaptar aos recursos disponíveis, uma vez que a disponibilidade de néctar e pólen também varia de acordo com os períodos de floração (Goulson 2003, Heinrich 2004).

Tendo em vista que a polinização é um dos processos chave na manutenção da diversidade, abundância e atividades dos organismos, têm-se os polinizadores como essenciais à reprodução da maioria das espécies de plantas com flores contribuindo para o ecossistema, pois sustentam as populações de plantas que muitos outros animais utilizam como alimento e abrigo (Klein *et al* 2007). Em contrapartida, muitas angiospermas recompensam os polinizadores com néctar e pólen, e 8–10% oferecem exclusivamente pólen (Buchmann 1983).

Essas interações planta-polinizadores são relações que na maioria das vezes envolvem ganhos para ambos: os polinizadores coletam recursos alimentares (principalmente pólen e néctar), e suas atividades favorecem a reprodução das plantas, onde aproximadamente 300.000 espécies de vegetais (quase 90% de todas as plantas com flores) necessitam da polinização animal para se reproduzirem (Ollerton *et al* 2011). Além disso, aproximadamente 75% das culturas agrícolas mostraram aumento na produção como resultado da polinização animal (Klein *et al* 2007).

Diversas plantas enfrentam a dificuldade entre incentivar a coleta de pólen, por meio de pistas visuais e olfativas (Dobson *et al* 2000, Lunau 2000), enquanto controlam sua remoção, por meio da dosagem, componentes mecânicos e tóxicos (Hargreaves *et al* 2009). Como as abelhas usam pistas olfativas (Dobson *et al* 2000) e visuais (Lunau 2000) para

detectar o pólen, elas também podem usar essas pistas para optar entre diferentes tipos de pólen. O pólen de espécies polinizadas por abelhas varia muito em sua composição: o conteúdo de proteína no grão de pólen varia de aproximadamente 2% a 60% (Roulston *et al* 2000), da mesma forma que os lipídios, pigmentos, compostos secundários e carboidratos também variam entre as espécies (Pacini & Hesse 2005).

Por isso é importante o conhecimento dos recursos florais visitados por *Bombus*, que ocorre principalmente a partir de levantamentos a campo (Ricciardelli 1990) e análise de cargas de pólen corbicular (Serini 1992). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar por meio de observação indireta, o uso das plantas para a coleta de recursos florais por *Bombus morio* Swederus (1787) e *Bombus pauloensis* Franklin (1913) e por meio da análise palinológica identificar quais plantas são de fato polinizadas por *Bombus* no Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Coletas

O estudo em campo foi feito em áreas de vegetação nativa e cultivada no Rio Grande do Sul no período da primavera e verão de 2017 a 2018. Espécimes de *Bombus morio* e *Bombus pauloensis* foram capturados com rede entomológica, diretamente no recurso floral enquanto forrageavam e posteriormente, transferidos para frascos plásticos e acondicionados em caixas de isopor com gelo até a chegada ao laboratório. As coletas foram feitas mediante autorizações do SISBIO (número de autorização: 59495-2) e SisGen (número de cadastro: A452394).

A espécie de planta visitada foi anotada na etiqueta de identificação. As plantas visitadas foram identificadas e as informações sobre as plantas e suas flores foram organizadas de acordo com o protocolo utilizado pela Rede de Catálogos Polínicos – RCPol

(<http://chaves.rcpol.org.br/eco?>) e Flora Brasil 2020

(<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>). Os espécimes coletados foram mortos em ultrafreezer (-80°C) e as bolotas de pólen quando presentes, removidas das corbículas e transferidas para eppendorf com um código de identificação.

As bolotas de pólen removidas de *B. morio* e *B. pauloensis* foram separadas e acondicionadas em eppendorf por recurso floral visitado, de acordo com cada município de coleta. As amostras de pólen foram identificadas por meio de análise palinológica feita no laboratório de Palinologia da Universidade Luterana do Brasil, Campus de Canoas-RS. A pesquisa possibilitou a identificação das espécies vegetais visitadas por *Bombus* no momento da coleta dos polinizadores e a análise palinológica possibilitou a identificação das espécies vegetais polinizadas por ambas as espécies durante o forrageio.

Preparação de amostra

As amostras de pólen presente nas corbículas foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Silva *et al* (2014) utilizando o método de acetólise proposto por Erdtman (1960). Primeiro o ácido acético foi adicionado ao grão de pólen para a retirada da umidade. Em seguida a amostra foi submetida à ação da solução de anidrido acético e ácido sulfúrico (acetólise) na proporção de 9:1. A acetólise serve para destruir a estrutura interna e tornar mais fácil a visualização das estruturas externas necessárias para identificação do grão de pólen. Posteriormente, adicionou-se glicerina a amostra. A glicerina deve permanecer em contato com o grão de pólen por 30 minutos, para conservar e manter o grão de pólen hidratado. Em seguida retira-se o sobrenadante ficando apenas os grãos de pólen que são transferidos para uma lâmina contendo gelatina de Kisser (Kisser 1935) e delimitadas com parafina. Foram preparadas 252 lâminas de pólen de 63 amostras.

Determinação da origem botânica do grão de pólen

As lâminas de pólen foram analisadas em microscópio óptico modelo Axio Scope A1 ZEISS (400x). Uma coleção palinológica e publicações de referência foram utilizadas para identificar as espécies de plantas (Palinoteca da ULBRA - Campus de Canoas-RS, Rede de Catálogos Polínicos online - RCPol 2014, Silva *et al* 2014, Radaeski *et al* 2014a, Radaeski *et al* 2014b, Bauermann *et al* 2013, Evaldt *et al* 2009). Para cada amostra, foram quantificados a partir de 500 grãos de pólen e identificados ao nível de espécie, gênero ou família (quando os grãos de pólen são muito semelhantes entre as espécies).

Análise de dados

Foi construída uma rede de interações de espécies de *Bombus*, recurso floral visitado e planta efetivamente polinizada, obtida a partir da identificação dos tipos polínicos encontrados nas corbículas dos polinizadores. Para construir a rede de interações foi utilizado o programa CoreIDRAW X8 (versão 2018).

Os dados dos tipos polínicos identificados foram analisados por meio da construção de diagramas contendo informações referentes ao percentual de tipos polínicos encontrados nas amostras e classificados quanto à espécie, gênero ou família (devido à semelhança entre os grãos de pólen) e tipos de plantas forrageadas (nativa ou introduzida). Para gerar o diagrama polínico foram utilizados os programas Tilia Graph software (version 2.0.41) e o CONISS software (Grimm 1987).

RESULTADOS

A espécie *B. morio* foi coletada visitando 10 espécies de plantas, listadas em ordem decrescente de visitação, e associada a 52 tipos polínicos identificados após o processamento das amostras de grão de pólen, e também listados em ordem decrescente de percentual polínico (Figura 1). A espécie *B. pauloensis* foi coletada visitando 06 espécies de plantas,

listadas em ordem decrescente de visitação, e associada a 38 tipos polínicos, também listados em ordem decrescente de percentual de pólen (Figura 2).

As plantas mais visitadas pelas espécies de *Bombus* estudadas foram *Jacaranda brasiliana* (Lam.) Pers. (23,14%), *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex DC.) Mattos (20,21%), *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (19,68%) e *Senna* cf. *macranthera* (DC. ex Collad.) H.S.Irwin & Barneby (12,50%), constituindo juntas mais de 75% das plantas com coletas dessa espécie no Rio Grande do Sul. No entanto o tipo polínico encontrado em maior quantidade nas amostras de pólen foi de *Solanum* sp., podendo sugerir ser o mais atrativo para ambas as espécies (Tabela 1).

C. peltophoroides foi o terceiro tipo polínico mais visitado por *Bombus* (19,68%) e um dos menores percentuais polínicos encontrados nas amostras, apenas 0,04%, enquanto que *S. cf. macranthera* obteve 12,50% de visitação e este, foi o terceiro tipo polínico mais encontrado nas amostras, constituindo 10,80% do pólen das amostras (Tabela 1). Isso nos leva a entender que *C. peltophoroides* é utilizada por *Bombus*, principalmente como fonte de néctar e *S. cf. macranthera* como fonte de pólen. Já o gênero *Solanum* foi um dos recursos sem coleta de *Bombus* no período da pesquisa e, no entanto, foi o tipo polínico mais abundante entre as amostras.

A origem botânica dos grãos de pólen mais abundantes identificados nas amostras de *B. morio* e *B. pauloensis* foi de *Solanum* (40,83%), *J. brasiliana* (14,84%), complexo de Myrtaceae (14,03%) e *S. cf. macranthera* (10,80%), que juntos constituíram mais de 80% dos tipos polínicos encontrados (Tabela 1). Grande parte dos grãos encontrados não correspondia em sua maioria às plantas visitadas pelas espécies de *Bombus* no período de coleta.

Dos tipos polínicos identificados nas amostras, alguns pertencem a plantas de importância agrícola, medicinal e ornamental, como: *Solanum* (ex.: tomateiro), Myrtaceae (ex.: goiabeira e pitangueira), Verbenaceae (ex.: erva-cidreira), Lamiaceae (ex.: alecrim,

orégano, menta, hortelã, sálvia), Asteraceae (ex.: alface, girassol, crisântemo, margarida), *Eucalyptus*, *Passiflora* cf. *edulis*, Fabaceae (ex.: vagens, ervilhas, feijões), Moraceae (ex.: figo, amora) e *Hibiscus rosa-sinensis*, respectivamente em ordem decrescente de percentual polínico, sendo a maioria dos grãos de pólen identificados pertencentes a espécies de plantas nativas (Figura 3a e 3b).

As espécies de *Bombus* com cargas de pólen nas corbículas foram coletadas visitando 11 espécies de plantas, e por meio da análise palinológica foram identificados 55 tipos polínicos (Tabela 1), confirmando o hábito generalista de *B. morio* e *B. pauloensis*. A rede de interações qualitativa para ambas as espécies, mostra que as visitas ocorreram em recursos florais semelhantes, exceto para *J. brasiliiana*, *Plerona granulosa*, *H. rosa-sinensis*, *Ziziphus joazeiro* e *Ceiba speciosa* que houve apenas coleta de *B. morio* e *Duranta erecta* com coleta apenas de *B. pauloensis* (Figura 2 e 3). Tendo em vista a grande quantidade de tipos polínicos encontrados e o número de ligações realizadas, destaca-se a relevância da diversidade de plantas no Rio Grande do Sul e a importância de *Bombus* como polinizadores em áreas de vegetação nativa e cultivada.

Dos 55 tipos polínicos encontrados nas amostras, 55,4% corresponde a árvore nativa; 1,3% árvore exótica; 1,0% arbusto nativo; 0,009% arbusto exótico; 41,1% erva nativa; 0,2% erva exótica; 0,03% liana nativa e 0,01% liana exótica. Portanto nota-se a preferência de *B. morio* e *B. pauloensis* em obter recursos (néctar e pólen) de plantas nativas, as quais constituíram mais de 98% dos grãos de pólen identificados, como mostra a figura 4.

Infere-se que alguns recursos florais sejam polinizados apenas por *B. morio*, pois nenhum grão de pólen dessas plantas foi encontrado em amostras de *B. pauloensis*, como: *J. brasiliiana*, *Bauhinia* tipo 2, *Lantana camara*, *Sapium*, tipo *Vernonia*, *Matayba elaeagnoides*, Moraceae, *Schinus terebenthifolius*, *Allophylus edulis*, *Begonia*, *Clerodendron*, Ericaceae,

Salix, *Ligustrum cf. sinense*, *Borreria* spp., *Guettarda uruguensis* e *Pinus*, apesar de que, em algumas amostras a quantidade de grão de pólen encontrada foi muito pequena (Figura 1 e 2).

Enquanto que as flores de Mimosoideae, Onagraceae e *Cedrela cf. odorata* presume-se que sejam polinizadas apenas por *B. pauloensis*, já que nenhum grão de pólen dessas plantas foi encontrado em amostras de *B. morio* (Figura 1 e 2). Apesar dessas espécies de *Bombus* terem comportamento semelhante, *B. morio* visitou e polinizou maior número de plantas (de acordo com a quantidade de tipos polínicos encontrados).

Durante as coletas, *B. morio* e *B. pauloensis* foram observados convivendo em harmonia com outros polinizadores (diversos gêneros de abelhas, borboletas, mariposas e pássaros), sem dominar a área de polinização, evidenciando sua importância para o processo de reprodução das plantas no ecossistema do Rio Grande do Sul.

Tabela 1 Porcentagem de plantas visitadas e tipos polínicos encontrados nas amostras de pólen coletados das corbículas de *Bombus morio* e *Bombus pauloensis* no Rio Grande do Sul (2017/18).

Plantas Visitadas (%)	Tipos polínicos (%)
<i>Jacaranda brasiliana</i> (23,14)	<i>Solanum</i> (40,83)
<i>Handroanthus chrysotrichus</i> (20,21)	<i>Jacaranda brasiliana</i> (14,84)
<i>Caesalpinia peltophoroides</i> (19,68)	<i>Senna cf. macranthera</i> (10,80)
<i>Senna macranthera</i> (12,50)	tricolporado poro circular ânulo (8,79)
<i>Lagerstroemia indica</i> (9,57)	Myrtaceae (5,64)
<i>Pleroma granulosa</i> (5,59)	Myrtaceae cf. <i>Myrcia multiflora</i> (3,44)
<i>Dahlia pinnata</i> (5,32)	<i>Pleroma granulosa</i> (3,41)
<i>Duranta erecta</i> (1,60)	Myrtaceae cf. <i>Acca sellowiana</i> (3,26)
<i>Ziziphus joazeiro</i> (1,06)	<i>Handroanthus</i> (1,94)
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (0,80)	Myrtaceae cf. <i>Eugenia</i> (1,69)
<i>Ceiba speciosa</i> (0,53)	<i>Erythroxylum</i> (1,16)
	<i>Bauhinia</i> tipo 2 (0,66)
	<i>Heimia myrtifolia</i> (0,63)
	Verbenaceae (0,57)
	Lamiaceae (0,47)
	<i>Lagerstroemia cf. indica</i> (0,28)
	<i>Duranta erecta</i> (0,26)
	<i>Lantana camara</i> (0,24)
	monossulcado cf. <i>Tradescantia pallida</i> (0,21)

Asteraceae (0,13)
 Sapium (0,11)
 Oxalis (0,08)
 Indeterminado (0,08)
 Mimosa (0,07)
 Eucalyptus (0,06)
Echium plantagineum (0,05)
 Poaceae (0,04)
 Caesalpinia (0,04)
 tipo *Vernonia* (0,03)
Passiflora cf. edulis (0,03)
 Fabaceae (0,03)
 tipo *Syagrus romanzoffiana* (0,03)
Matayba elaeagnoides (0,02)
 Moraceae (0,02)
 Tipo *Butia* (0,02)
Schinus terebenthifolius (0,01)
 Lonicera japônica (0,01)
 Allophylus edulis (0,01)
Hibiscus rosa-sinensis (0,01)
 Cardiospermum (0,01)
 Begonia (0,01)
 Clerodendron (0,01)
 Ericaceae (0,003)
 Bauhinia (0,003)
Ziziphus joazeiro (0,003)
 Loranthaceae (0,003)
Ceiba speciosa (0,003)
 Salix (0,003)
Ligustrum cf. sinense (0,003)
 Borreria (0,003)
Guettarda uruguensis (0,003)
 Pinus (0,003)*
 Mimosoideae (0,003)
 Onagraceae (0,003)
Cedrela cf. odorata (0,003)

* O grão de pólen do *Pinus* encontrado nas amostras analisadas possivelmente se trate de algum tipo de contaminação, seja pelo fato do *Bombus* ter visitado uma planta em que havia caído pólen da flor, ou por alguma contaminação ocasionada pelo vento, pois o *Pinus* é uma planta cuja polinização é anemófila. Figura 1a – Rede de interações entre *Bombus morio*, plantas visitadas e tipos polínicos encontrados nas corbículas. Rio Grande do Sul, 2017/18.

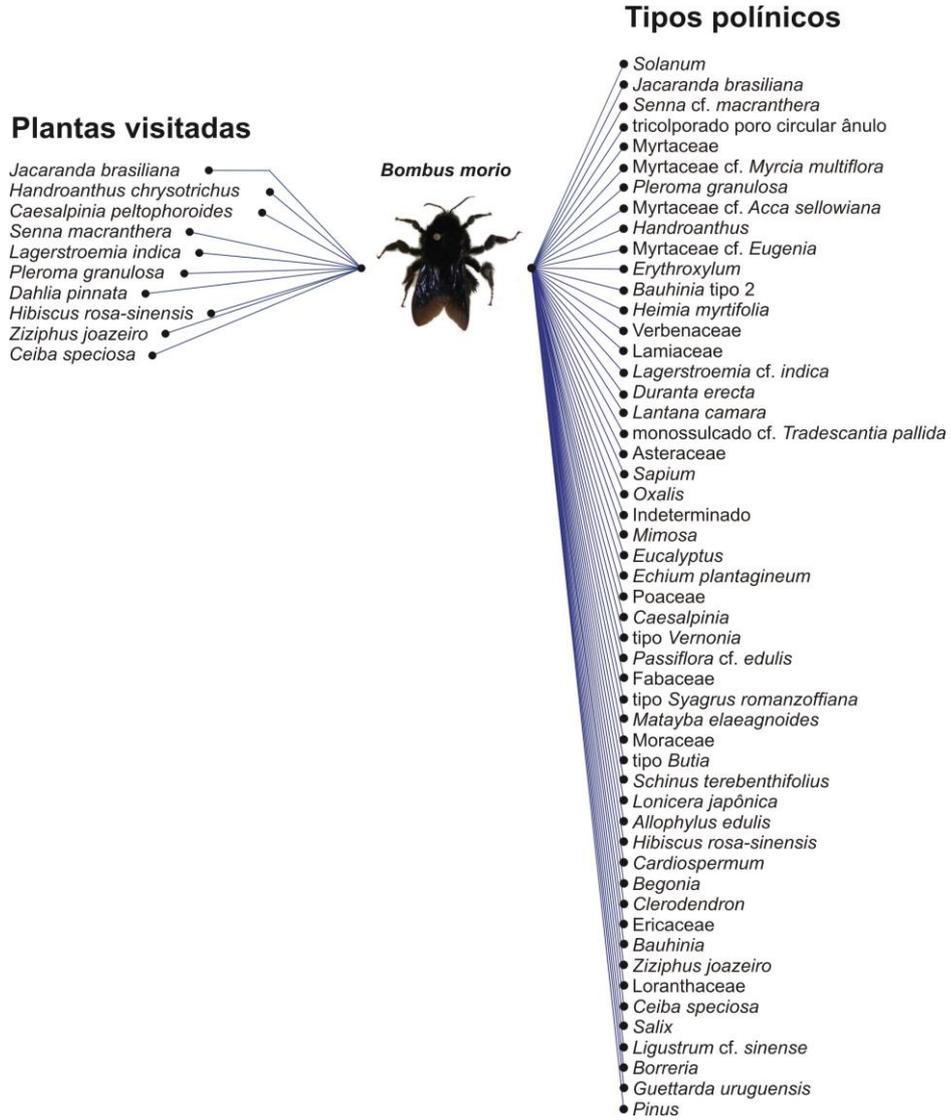


Figura 1 Rede de interações entre *Bombus morio*, plantas visitadas e tipos polínicos encontrados nas corbículas. Rio Grande do Sul, 2017/18.

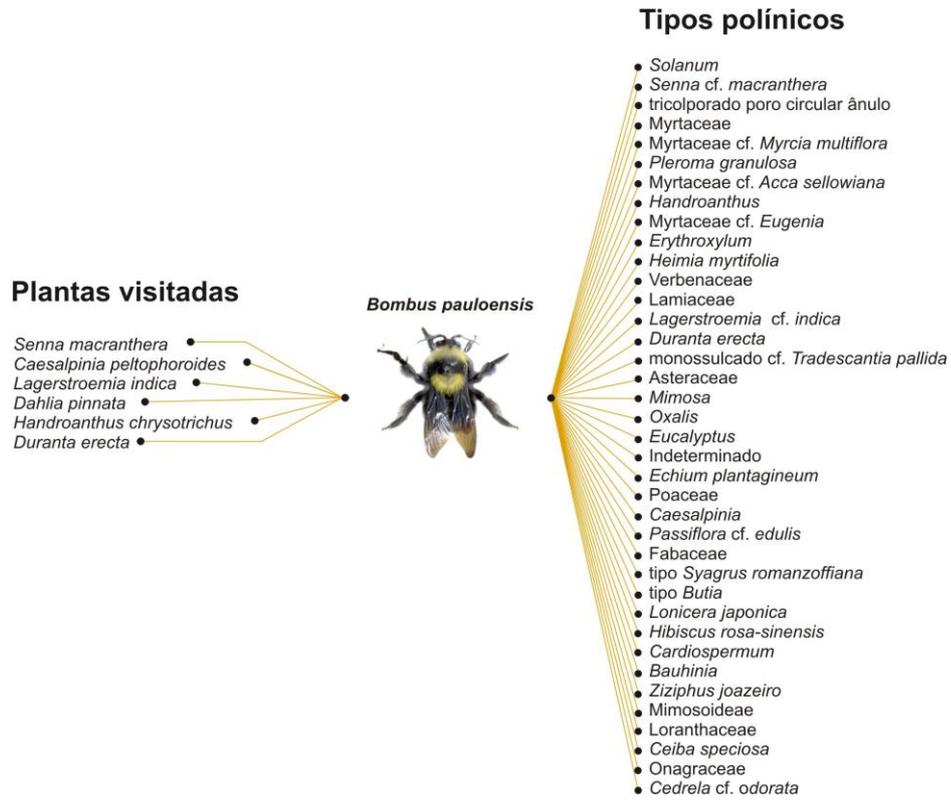


Figura 2 Rede de interações entre *Bombus pauloensis*, plantas visitadas e tipos polínicos encontrados nas corbículas. Rio Grande do Sul, 2017/18.

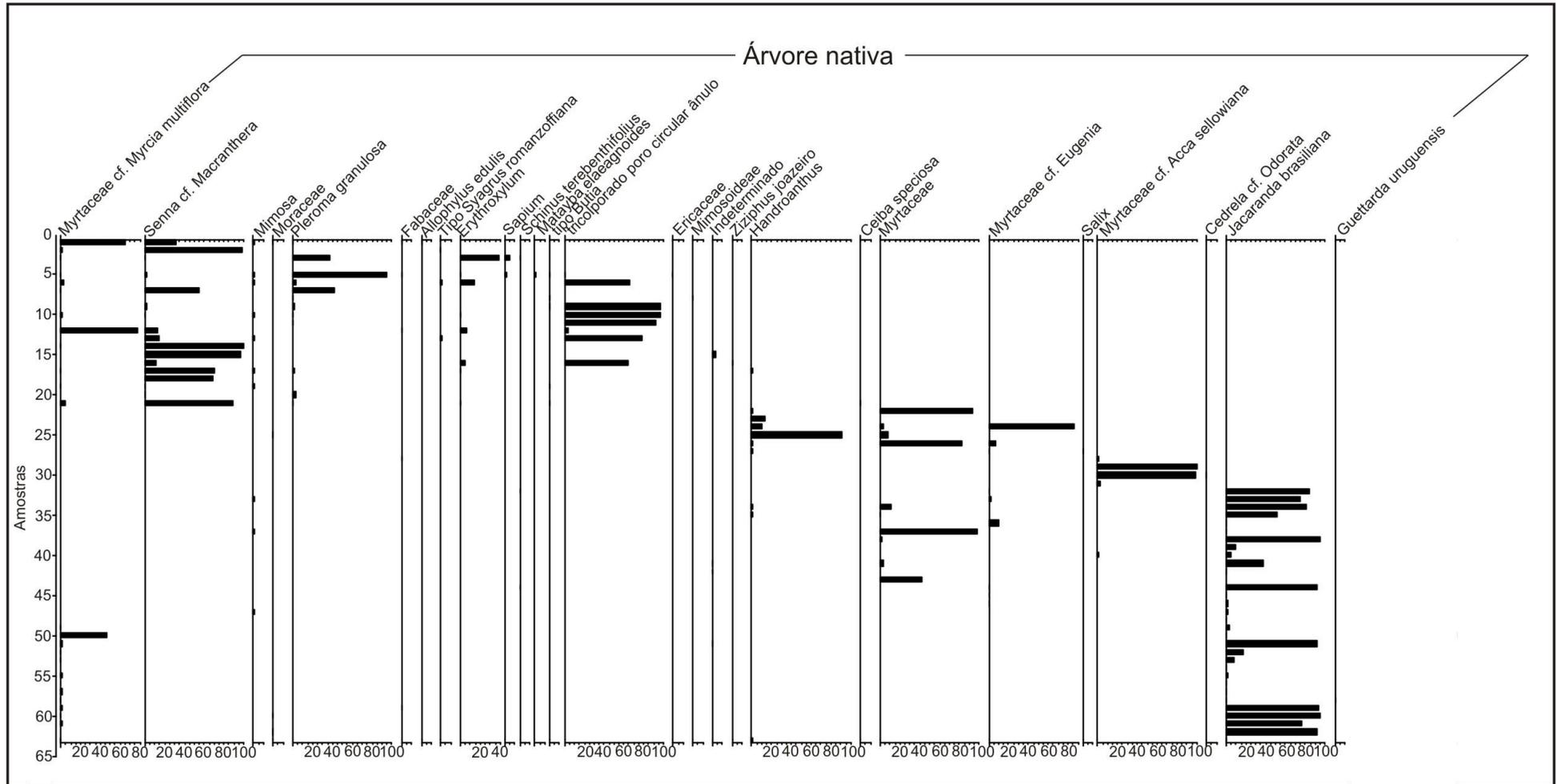


Figura 3a Diagrama de porcentagem polínica das amostras coletadas das corbículas de *Bombus morio* e *Bombus pauloensis* no Rio Grande do Sul (2017/18).

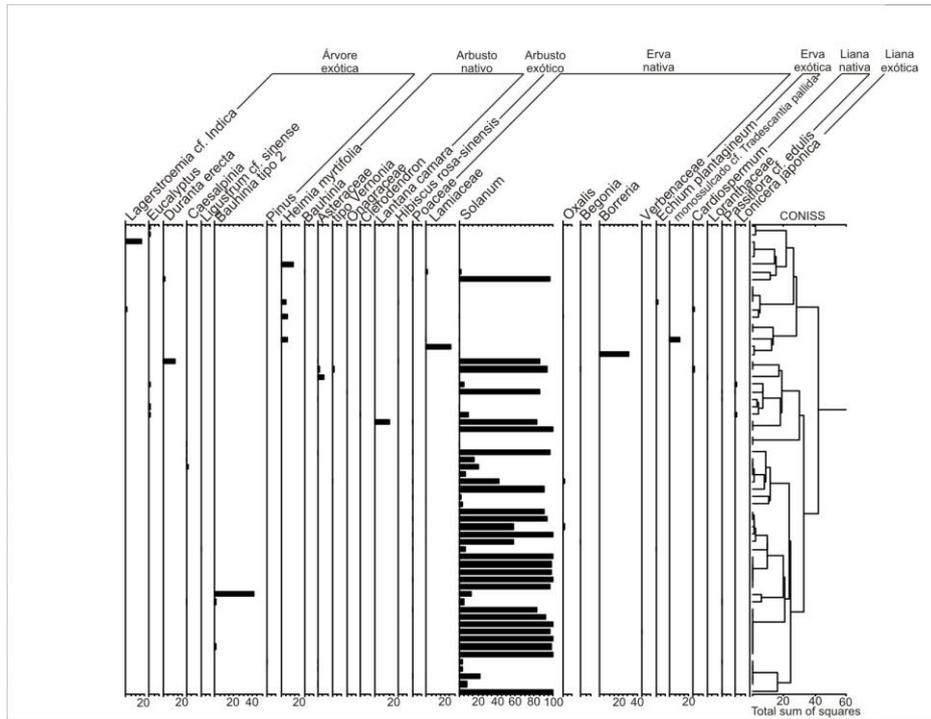


Figura 3b (continuação) – Diagrama de porcentagem polínica das amostras de pólen coletados das corbículas de *Bombus morio* e *Bombus pauloensis* no Rio Grande do Sul (2017/18).

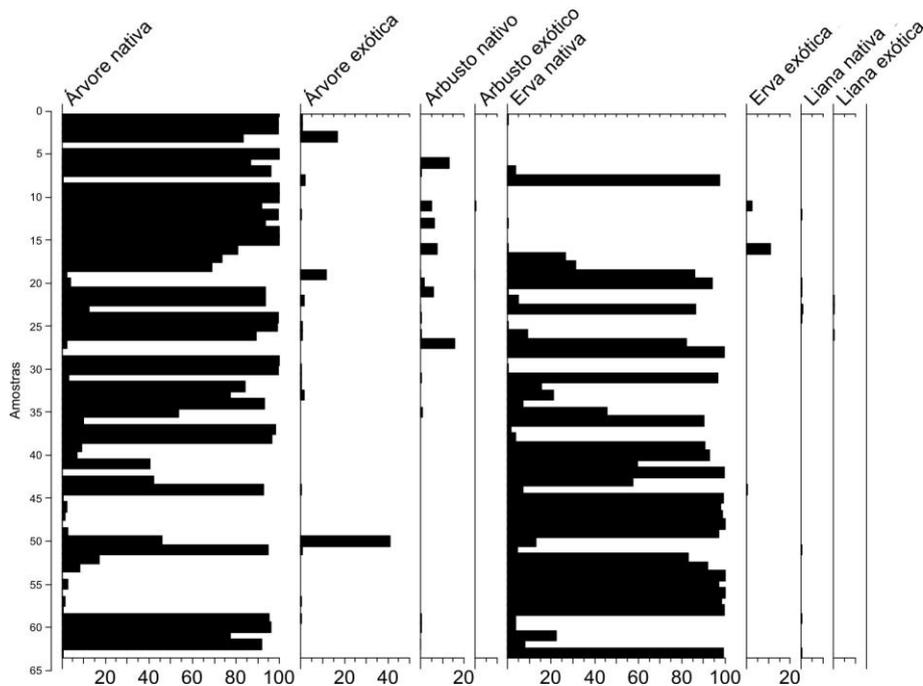


Figura 4 Tipos de plantas polinizadas por *Bombus morio* e *Bombus pauloensis*.

DISCUSSÃO

A análise polínica das amostras revelou que a espécie *B. morio* está associada a mais tipos polínicos que a espécie *B. pauloensis*, assim como obteve maior número de interações entre os recursos florais visitados. Contudo, ambas as espécies foram coletadas na maioria das vezes, com grande quantidade de cargas de pólen, o que infere serem polinizadores importantes para a diversidade de espécies vegetais no Estado.

Embora alguns recursos florais possam ser utilizados por *B. morio* e *B. pauloensis* como fonte de néctar, existindo pouco ou nenhum contato com o pólen e, portanto não beneficiando a planta com a polinização, outros recursos são utilizados por *Bombus* principalmente para coleta de pólen e assim, contribuindo para o processo reprodutivo vegetal.

De acordo com Alves-dos-Santos *et al* (2016), é importante observar o comportamento dos visitantes florais para verificar se existe contato com as partes reprodutivas das flores (antras e estigma) de forma a identificar os polinizadores efetivos. E segundo Cortopassi-Laurino *et al* (2003), em algumas flores tubiformes como agapanto (*Agapanthus africanus*) e ipê (*Tabebuia* spp.) as mamangavas coletam o néctar através de orifícios feitos por outras abelhas na corola, não participando efetivamente na polinização.

A característica natural de polinização de cada espécie de *Bombus* pode ser observada pela quantidade de grãos de pólen contida nas amostras polínicas analisadas. Para *B. morio* e *B. pauloensis* o tipo polínico encontrado em maior quantidade nas amostras de pólen foi de *Solanum*, permitindo inferir que a flor de espécies desse gênero de planta é mais atrativa para ambas as espécies de *Bombus* do que as outras espécies florais visitadas e com pólen presente, ou visitadas e cujo pólen não foi encontrado, apesar de que *Solanum* foi uma das plantas menos abundantes no nosso campo visual nas áreas amostradas.

Algumas plantas de importância econômica como tomate (*Solanum lycopersicum*), berinjela (*S. melongena* L.), jiló (*S. gilo* Raddi), pimentas e pimentões (*Capsicum* spp.), espécies da família

Solanaceae, possuem flores com anteras poricidas e são beneficiadas pela polinização por vibração (Raw 2000). As abelhas do gênero *Bombus* possuem o mecanismo de vibrar as anteras para facilitar a liberação do grão de pólen (Morandin *et al* 2001a, Morandin *et al* 2001b, Velthuis & Van Doorn 2006), e as plantas do gênero *Solanum*, que obtiveram maior representatividade nas amostras analisadas, são beneficiadas por essa característica, o que pode justificar a preferência por esse recurso floral. Essa síndrome de polinização foi denominada polinização por vibração ou “buzz-pollination” por Buchmann (1983), e existem dois meios naturais de vibração: ação do vento ou visita de abelhas capazes de vibrar a flor (Nunes-Silva *et al* 2010).

A eficiência de cada polinizador pode ser estimada pela contagem do número de grãos de pólen transferidos para o estigma durante uma única visita (Dafni *et al* 2005, Delaplane *et al* 2013). Em nossa pesquisa, não foi observado a transferência de grão de pólen das espécies de *Bombus* para o estigma, mas por meio da análise palinológica revelou-se que *B. morio* e *B. pauloensis* são visitantes de flores de muitas espécies cultivadas e nativas no Rio Grande do Sul, no entanto, algumas são utilizadas por *Bombus* em maior quantidade e para coleta de recursos diferentes (pólen e néctar). Este resultado está de acordo Heinrich (1976), que afirmou que, embora algumas abelhas utilizem flores de uma ampla gama de espécies de plantas, esses indivíduos tendem a se especializar.

Ambas as espécies de *Bombus* estudadas estão associadas a diversos recursos florais ao longo do período da primavera e verão no Estado, característica importante para um polinizador generalista, pois de acordo com Heinrich (1976), Heinrich (2004) e Goulson (2003), indivíduos de *Bombus* podem escolher uma espécie de planta como seu principal recurso e, ocasionalmente, visitar outras espécies o que lhes permitiria acompanhar as mudanças de florescimento.

Muitas espécies de plantas concentram-se na produção de pólen e/ou néctar em diferentes horários do dia, devido às condições fisiológicas e ambientais variáveis, incluindo a concorrência

com outras plantas para atrair polinizadores (Rossi *et al* 2015) beneficiando os polinizadores que possuem a capacidade de se adaptar aos recursos florais disponíveis.

As abelhas são capazes de identificar os momentos em que os recursos estão disponíveis para visitar as flores (Michener 1974). A coleta de pólen e néctar por abelhas parece ter um comportamento muito flexível, influenciado entre outros fatores pela disponibilidade temporal e espacial de pólen e néctar das diferentes espécies botânicas presentes no seu forrageamento (Goulson 2003, Heinrich 2004).

A abundância e densidade de floração de plantas é um fator significativo que influencia no forrageamento (Wolf & Moritz 2008). Por tanto, a análise palinológica das cargas de pólen presente nas corbículas é importante para identificar quais plantas são de fato polinizadas por *B. morio* e *B. pauloensis*, pois só com a observação de visitação não é possível afirmar se as espécies de *Bombus* são polinizadores efetivos ou apenas visitantes florais de determinado recurso floral.

Para as espécies *B. morio* e *B. pauloensis*, não foi observada em campo a constância floral, apenas a visitação a flor, mas por meio da análise palinológica foi identificada a preferência floral por quatro tipos de recursos, sendo o maior deles (*Solanum*) beneficiado pelo mecanismo de vibração das anteras (Michener 1962), que de acordo com Velthuis & Van Doorn (2006) é uma característica presente em abelhas do gênero *Bombus*.

Segundo Coronel *et al* (2018), *B. pauloensis* é um polinizador eficiente de cultivos hortofrutícolas colombianos, sendo principalmente utilizado em tomateiro (*Solanum lycopersicum*). De acordo com Aldana *et al* (2007), frutos de tomate obtidos por meio da polinização realizada por *B. pauloensis* tiveram significativamente maior teor de massa fresca (40,9%), maior diâmetro equatorial (14,3%), e apresentaram significativamente mais sementes (103,3%) e proporção de lóculos bem desenvolvidos (42,2%) em comparação com frutos obtido por autopolinização.

Em estudos realizados por Riano *et al* (2015), a polinização de pimentão mediada por *B. pauloensis* teve efeito positivo nas variáveis avaliadas (tamanho, massa seca do fruto e número de

sementes) com acréscimo superior a 40%. A visita de *B. pauloensis* em morangueiro cultivado em estufa melhorou as características de diâmetro (35% e 31%), comprimento (28% e 19%), massa fresca (103% e 90%), massa seca 126% e 145 %) e número de sementes (55% e 81%) para as cultivares "Camino Real" e "Ventana" respectivamente (Coronel *et al* 218), demonstrando ser um polinizador eficiente para diversas culturas.

Em nossa pesquisa, foi identificada a preferência de *B. morio* e *B. pauloensis* em obter pólen de árvores e ervas nativas, característica importante para a preservação dos recursos nativos presentes no Estado. Resultado semelhante foi encontrado por Rossi *et al* (2015) que relatam a preferência de espécies nativas de *Bombus* em adquirir recursos de espécies de plantas nativas.

Grande parte dos tipos polínicos encontrados nas amostras de *B. morio* e *B. pauloensis* não correspondiam em sua maioria às plantas visitadas por elas no período de coleta, no entanto, difere dos estudos realizados por Rossi *et al* (2015) em que a origem botânica do grão de pólen para a maioria das espécies de *B. pauloensis* e *B. bellicosus*, mais abundantes nas amostras de pólen, pertenciam às espécies vegetais em que foram coletadas.

As espécies *B. morio* e *B. pauloensis* possuem comportamento semelhante de visitação floral e polinização, e embora *B. morio* se sobressaia em termos de quantidade de plantas visitadas e tipos polínicos encontrados, ambas as espécies são importantes polinizadores em áreas de vegeta o nativa e cultivada, sendo eficientes para a manutenção da diversidade de plantas no Estado.

  importante proteger a biodiversidade dos polinizadores, especialmente as espécies de *Bombus* presentes no Rio Grande do Sul, por serem importantes para a reprodução de 54 tipos de plantas, identificadas por meio da análise polínica, associadas a 98% de plantas nativas, além de está presente em diversos sistemas ecológicos (estando presente em 11 biomas que compõem o Estado). De acordo com Aldana *et al* 2007, Riano *et al* 2015 e Coronel *et al* 2018, a poliniza o mediada por *Bombus* proporciona aumento na produ o agrícola de culturas importantes por eles polinizados, principalmente as solanáceas, que necessitam do mecanismo de vibra o promovido

por *Bombus* para liberarem os grãos de pólen, uma vez que, flores bem polinizadas produzem frutos de melhor qualidade, maior peso e maior número de sementes. E para proteger esses polinizadores é necessário conservar os remanescentes de florestas (locais propícios para nidificação) e preservar os recursos florais utilizados por eles.

Contribuição dos autores

JGS e MB coletaram material em campo; JNR confeccionou as redes de interações e os diagramas; JGS redigiu o manuscrito; JGS, SGB e CIS revisaram criticamente o manuscrito; e JVCG a concepção, planejamento e provisão das condições para a execução do projeto, além da revisão final do manuscrito.

Agradecimentos

A Professora Dra. Soraia Girardi Bauermann, coordenadora do Laboratório de Palinologia da ULBRA em Canoas-RS, por permitir a realização da análise polínica e identificação dos grãos de pólen no Laboratório de Palinologia.

REFERÊNCIAS

- Abrahamovich AH, Díaz N (2001) Distribución geográfica de las especies del género *Bombus* Latreille (Hymenoptera, Apidae) em Argentina. *Revista Brasileira de Entomologia* 45 (1): 23-26
- Aldana J, Cure JR, Almanza MT, Vecil D, Rodríguez D (2007) Efecto de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) sobre la productividad de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) bajo invernadero en la Sabana de Bogotá, Colombia. *Agronomía Colombiana* 25, p 62-72
- Alves-dos-Santos I, Silva CI, Pinheiro M, Kleinert AMP (2016) Quando um visitante floral é um polinizador? *Rodriguésia* 67 (2): 295-307
- Bauermann SG (2013) Pólen nas angiospermas – diversidade e evolução. Ulbra Canoas, p 216
- Buchmann SL (1983) Buzz pollination in angiosperms. In *Handbook of experimental pollination biology* (eds CE Jones, RJ Little). New York, NY: Van Nostrand Reinhold Company, p 73-113

- Coronel CAP, Jiménez DR, Benavides LA, Cure JR (2018) Eficiencia de polinización de colonias huérfanas de *Bombus atratus* (Hymenoptera: Apidae) en fresa (*fragaria x ananassa*) bajo cubierta. *Acta Biológica Colombiana* 23 (1): 73-79
- Cortopassi-Laurino M, Knoll FRN, Imperatriz-Fonseca VL (2003) Nicho trófico e abundância de *Bombus morio* e *Bombus atratus* em diferentes biomas brasileiros. In: Melo, G.A.R. & Alves-dos-Santos, I. (Eds.) – Apoidea eotropical: *Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure*. ed. UNESCO, Criciúma, p 285-296
- Dafni A, Kevan PG, Husband BC (2005) *Practical pollination biology*. Enviroquest, Ontario
- Delaplane KS, Danka RG, Freitas BM, Garibaldi LA, Goodwin RM, Hormaza JI (2013) Standard methods for pollination research with *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research* 52: 1-28
- Dobson HEM, Bergstro MG (2000) The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution* 222: 63-87
- Erdtman G (1960) The acetolized method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift* 54: 561-564
- Evaldt ACP, Bauermann SG, Fuchs SCB, Diesel S, Cancelli RR (2009) Grãos de pólen e esporos do Vale do Rio Caí, nordeste do Rio Grande do Sul, Brasil: descrições morfológicas e implicações paleoecológicas. *Gaea* 5 (2): 86-106
- Goulson D (2003) *Bumblebees: their behaviour and ecology*. Oxford University Press, Oxford, p 235
- Grimm EC (1987) CONISS: A FORTRAN 77 program for stratigraphically constrained cluster analysis by the method of incremental sum of squares. *Computers & Geosciences* 13 (1): 13-35
- Hargreaves A, Harder L, Johnson S (2009) Consumptive emasculation: the ecological and evolutionary consequences of pollen theft. *Biological Reviews* 84: 259-276
- Heinrich B (1976) The foraging specializations of individual bumblebees. *Ecological Monographs* 46: 105-128
- Heinrich B (2004) *Bumblebee economics*. Harvard University Press, Cambridge, p 251
- Kisser J (1935) Bemerkungen zum Einschluss in glycerin gelatine. *Z. Wiss. Mikr* 51pp. apud Erdtman, G. *Pollen Morphology and Plant Taxonomy – Angiosperms*, 1952, p 7-8
- Klein AM, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences* 274: 303-313
- Lunau K (2000) The ecology and evolution of visual pollen signals. *Plant Systematics and Evolution* 222: 89-111
- Michener CD (1962) An interesting method of pollen collecting by bees from flowers with tubular anthers. *Revista de Biologia Tropical* 10(2): 167-175

Michener CD (1974) The social behavior of bees. Belknap, Cambridge, Mass

Morales CL, Aizen MA (2004) "Potential displacement of the native bumble bee *Bombus dahlbomii* by the invasive *Bombus ruderatus* in NW Patagonia". In K Hartfelder, D De Jong et al., (Eds). Proceedings of the 8th International Conference on Tropical Bees and VI encontro sobre abelhas p. 7-76. International Bee Research Association

Morandin LA, Lavery TM, Kevan PG (2001a) Effect of bumble bee (Hymenoptera: Apidae) pollination intensity on the quality of greenhouse tomatoes. *Journal of Economic Entomology* 94: 172-9

Morandin LA, Lavery TM, Kevan PG (2001b) Bumble bee (Hymenoptera: Apidae) activity and pollination levels in commercial tomato greenhouses. *Journal of Economic Entomology* 94: 462-7

Nunes-Silva P, Hrnčir M, Imperatriz-Fonseca VL (2010) A polinização por vibração. *Oecologia Australis*, Rio de Janeiro 14 (1): 140-151

Ollerton J, Winfree R, Tarrant S (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326

Pacini E, Hesse M (2005) Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora* 200: 399-415

Radaeski JN, Evaldt ACP, Bauermann SG, Lima GL (2014a) Diversidade de grãos de pólen e esporos dos Campos do sul do Brasil: descrições morfológicas e implicações paleoecológicas. *Iheringia, Série Botânica* 69 (1): 107-132

Radaeski JN, Evaldt AC, Bauermann SG (2014b) Grãos de pólen de espécies ocorrentes na Unidade de Conservação Parque Estadual do Espinilho, Barra do Quaraí, Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas Botânica* 65: 305-331

Raw A (2000) Foraging behaviour of wild bees at hot pepper flowers (*Capsicum annuum*) and its possible influence on cross pollination. *Annals of Botany* 84: 487-492

Rede de Catálogos Polínicos Online (RCPol). Disponível em: <<http://rcpol.org.br/pt/home/>> Acesso em: 22 jan. 2019.

Riano DJ, Pacateque JE, Cure JR, Rodriguez D (2015) Comportamiento y eficiencia de polinización de *Bombus atratus* Franklin en pimentón (*Capsicum annum* L.) sembrado bajo invernadero. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* [online] 9 (2): 259-267

Ricciardelli D'albore G (1990) Flora ornamentale visitata dalle api e dai bombi. - *Ape Nostra Amica* 12: 4-11

Ricketts T, Regetz J, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Bogdanski A, Gemmill-Herren B, Greenleaf SS, Klein AM, Mayfield MM, Morandin LA, Ochieng A, Viana BF (2008) Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecol. Lett.* 11:499-515.

- Rossi N, Santos E, Salvarrey S, Arbulo N, Invernizzi C (2015) Determination of flower constancy in *Bombus atratus* Franklin and *Bombus bellicosus* Smith (Hymenoptera: Apidae) through palynological analysis of nectar and corbicular pollen loads. *Neotropical Entomology* 44: 546-552
- Roulston T, Cane J, Buchmann S (2000) What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen–pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs* 70: 617-643
- Serini GB (1992) Seasonal variations in the pollinators *Apis mellifera* L. and *Bombus* spp. in the "Massicio del Campo dei Fiori" area (Varese, Northern Italy). *Ethology, Ecology & Evolution. Special Issue 2*: 37-42
- Silva CI, Imperatriz-Fonseca VL, Groppo M, Bauermann SG, Saraiva AM, Queiroz EP, Evaldt ACP, Aleixo KP, Castro JP, Castro MMN, Faria LB, Caliman MJF, Wolff JL, Paulino Neto HF, Garófalo CA (2014) Catálogo polínico das plantas usadas por abelhas no Campus da USP de Ribeirão Preto. *Holos, Ribeirão Preto*, p 153
- Smith-Ramírez C, Martínez P, Nuñez M, González C, Armesto JJ (2005) Diversity and preferences of pollinators in second-growth forests of Chiloé Island, Chile. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 399-416
- Velthuis HH, Van Doorn A (2006) A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie* 37: 420-451
- Wolf S, Moritz RFA (2008) Foraging distance in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39: 419-427

6 ARTIGO 3

Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais
Ibero-American Journal of Environmental Sciences

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM *BOMBUS* SPP. (HYMENOPTERA: APIDAE) EMPREGANDO O MÉTODO QUECHERS MODIFICADO E LC-MS/MS E GC-MS/MS

JG SILVA¹, JG SILVA², R ZANELLA³, JVC GUEDES¹

¹Departamento de Proteção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

²Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil

³Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

Os polinizadores são fundamentais para a reprodução de diversas espécies de plantas com flores, atuando na transferência de grão de pólen de uma flor para outra. No entanto, suas atividades forrageiras os expõem em contato com diversos poluentes, incluindo os agrotóxicos. Pesquisas sobre efeitos adversos de agrotóxicos em abelhas do gênero *Bombus* são escassos no Brasil, e por serem insetos polinizadores, é importante realizar estudos que avaliem a suscetibilidade deles aos agrotóxicos utilizados na agricultura. Para a avaliação dos resíduos de agrotóxicos utilizados na agricultura para controle de pragas na cultura da soja no Rio Grande do Sul, foi empregado o método QuEChERS para a determinação de multirresíduo de agrotóxicos no corpo de abelhas. As abelhas do gênero *Bombus* utilizados na pesquisa foram coletados enquanto forrageavam em áreas de vegetação agrícola e urbana no Estado. O método QuEChERS para extração multirresíduo, envolve extração inicial em acetonitrila, etapa de partição após a adição de sal e uma etapa de limpeza utilizando extração em fase sólida dispersiva. No preparo das amostras de *Bombus* spp. foi empregado o método QuEChERS para isolar os analitos das matrizes a serem estudadas. Na identificação e quantificação dos analitos foi utilizado um cromatógrafo líquido e gasoso acoplado a um detector de massas (LC-MS/MS e GC-MS/MS), para detecção de 119 compostos de diferentes classes, tais como, inseticidas e fungicidas. Dos 119 agrotóxicos analisados, apenas azoxistrobina, acetamiprido e metomil, apresentaram resíduos detectáveis nas amostras analisadas, no entanto, a azoxistrobina foi detectada na concentração abaixo do limite de quantificação do método (LOQ) para as amostras de *B. morio* coletados no município de Júlio de Castilho, enquanto que, o acetamiprido e metomil, obtiveram resíduos de agrotóxicos detectados acima do limite de quantificação do método também em amostras de *B. morio*, coletados nos municípios de Santiago e Capão do Cipó. Nos demais compostos (116), a concentração de agrotóxico obtida foi menor que o limite de detecção do método (LOD).

Palavras-chave: polinizadores; forrageamento; contaminação; cromatografia.

Determination of pesticide residues in *Bombus* spp. (Hymenoptera: Apidae) using the modified Quechers method and LC-MS/MS and GC-MS/MS

JG SILVA¹, JG SILVA², R ZANELLA³, JVC GUEDES¹

¹Departamento de Proteção Vegetal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

²Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil

³Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

ABSTRACT

Pollinators are essential for the reproduction of several species of flowering plants, acting on the transfer of pollen grain from one flower to another. However, their foraging activities as they explain in contact with various pollutants, including pesticides. Research on the adverse effects of pesticides on *Bombus* bees is scarce in Brazil, and because they are pollinating insects, it is important to carry out studies that assess their susceptibility to pesticides used in agriculture. For the evaluation of pesticide residues used in agriculture to control pests in soybean culture in Rio Grande do Sul, the QuEChERS method was used to determine multiresidue of pesticides in the body of bees. The *Bombus* bees used in the research were collected while foraging in areas of agricultural and urban vegetation in the State. The QuEChERS method for multi-residue extraction, involves initial extraction in acetonitrile, partitioning step after the addition of salt and a cleaning step using dispersive solid phase extraction. Do not prepare *Bombus* spp. the QuEChERS method was developed to isolate the analytes from the matrices to be studied. In the identification and quantification of the analytes, a liquid and gas chromatograph coupled to a mass detector (LC-MS/S and GC-MS/MS) was used to detect 119 compounds of different classes, such as insecticides and fungicides. Of the 119 promised pesticides, only azoxystrobin, acetamiprid and metomil, were detectable in the analyzed, but azoxystrobin was detected in the concentration below the method quantification limit (LOQ) for *B. morio* collected in the municipality of Júlio de Castilho, while acetamipride and metomil, obtained residues of pesticides detected above the limit of quantification of the method also in samples of *B. morio*, collected in the municipalities of Santiago and Capão do Cipó. In the other compounds (116), the concentration of pesticides obtained was below the limit of detection of the method (LOD).

Keywords: pollinators; foraging; contamination; chromatography.

INTRODUÇÃO

As abelhas são importantes polinizadores, sendo fundamentais para a reprodução de diversas espécies de plantas com flores, atuando na transferência de grão de pólen de uma flor para outra (BREEZE et al., 2011). No entanto, sua atividade forrageira os expõe em contato com diversos poluentes, incluindo os agrotóxicos (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2013).

As populações de abelhas, principalmente *Apis mellifera*, vêm sendo submetidas a um declínio mundial, associado ao distúrbio do colapso das colmeias (CCD) e enfraquecimento da colônia (POTTS et al., 2010; VANENGELSDORP et al., 2009). Esse distúrbio proporciona uma perda drástica de abelhas adultas da colmeia sem qualquer evidência de mortalidade (VANENGELSDORP et al., 2009).

Suspeita-se que o declínio da população de abelhas resulta de uma combinação de vários fatores que poderia enfraquecê-las (PARADIS et al., 2014), entretanto, a utilização indiscriminada de agrotóxicos em cultivos agrícolas são apontados como a principal causa da mortalidade de abelhas (*A. mellifera*) e enfraquecimento de colônias, por pesquisadores e apicultores no Brasil e em vários países do mundo.

Os agrotóxicos são substâncias utilizadas com o propósito de prevenir, destruir ou controlar pragas agrícolas e com isso garantir alimento para uma população em constante crescimento. No entanto, sua utilização excessiva e sem critério tem causado impactos diretos e indiretos a saúde humana, animal e ao meio ambiente (FERRER et al., 2007). Muitos agrotóxicos usados na proteção de plantas, como o fipronil, imidaclopride, tiametoxam e deltametrina, são tóxicos para abelhas e são suspeitos de estarem envolvidos em perdas de colônias de *Apis mellifera* (VAN DER SLUIJS et al., 2013).

As abelhas são expostas a combinações de produtos químicos que podem provocar efeitos adversos em doses muito baixas (COLIN & BELZUNCES, 1998), sendo importante a quantificação simultânea de grande número de substâncias em baixos níveis de concentração (PARADIS et al., 2014). Pesquisas sobre efeitos adversos de agrotóxicos em abelhas do gênero *Bombus* são escassas no Brasil, e por serem insetos polinizadores, é importante realizar estudos que avaliem a suscetibilidade deles aos agrotóxicos comumente utilizados na agricultura.

O preparo de amostras para a determinação de níveis de agrotóxicos tem sido objeto de constantes estudos. A presença de interferentes que são extraídos junto com os analitos de interesse torna a detecção, identificação e quantificação de resíduos de agrotóxicos mais difíceis, especialmente em matrizes com diferentes constituintes, como o pólen apícola e abelhas. Buscando atender aos organismos reguladores, que estabelecem os níveis de resíduos permitidos, muitos

métodos e técnicas têm sido utilizados no aperfeiçoamento do preparo de amostras para determinação de agrotóxicos, uma vez que a análise de resíduos de agrotóxicos em amostras de abelhas e pólen apícola é de extrema importância em termos de segurança e equilíbrio ambiental (SAIBT, 2017).

A presente pesquisa teve como objetivo determinar e quantificar a presença de resíduos de agrotóxicos em amostras de abelhas do gênero *Bombus* coletadas no Rio Grande do Sul, Brasil. Para esse estudo, foi empregado o método Quechers, uma técnica baseada em três etapas principais: (1) extração com acetonitrila; (2) partição promovida pela adição de sais, por exemplo: sulfato de magnésio (MgSO₄) e cloreto de sódio (NaCl) e (3) limpeza do extrato empregando a técnica denominada Extração em Fase Sólida Dispersiva (ZANELLA et al., 2015), com o objetivo de gerar extratos que possam ser analisados por Cromatografia Líquida e Cromatografia Gasosa acopladas a Espectrometria de Massas em Série (LC-MS/MS e GC-MS/MS), sendo possível analisar 119 agrotóxicos utilizados na agricultura para proteção de plantas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de material

As coletas de *Bombus* spp. foram realizadas com rede entomológica no início do verão de 2019, período que se iniciam as aplicações de agrotóxicos para o controle de pragas na cultura da soja no Rio Grande do Sul. Quando necessário, utilizaram-se cabos adaptadores para facilitar a coleta de *Bombus* em árvores de grande porte. As coletas foram realizadas mediante autorizações do SISBIO (número de autorização: 59495-2) e SisGen (número de cadastro: A452394).

Os *Bombus* foram coletados em oito municípios do Rio Grande do Sul (Tabela 1) diretamente no recurso floral visitado durante o forrageamento, em áreas de vegetação agrícola e urbana. As plantas visitadas foram identificadas de acordo com informações registradas no site da Rede de Catálogos Polínicos – RCPol (<http://chaves.rcpol.org.br/eco?>) e Flora Brasil 2020 (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do#CondicaoTaxonCP>). Em cada ponto de coleta as coordenadas geográficas foram marcadas com auxílio de um GPS (Garmin).

Nos municípios amostrados, foram realizadas observações nos recursos florais existentes e quando detectada a presença de *Bombus*, estes eram coletados e transferidos para frascos plásticos. Foram coletados 10 exemplares de *Bombus* spp. por município amostrado. Os espécimes coletados foram mortos em ultrafreezer vertical (-80°C) e transferidos para tubos tipo Falcon, separados de acordo com o município de coleta e espécies de *Bombus* coletadas. As espécies de *Bombus* foram

etiquetadas e acondicionadas em freezer a -20°C até a realização da análise de resíduos de agrotóxicos.

Tabela 1 Municípios da região central do Rio Grande do Sul com coletas de *Bombus* spp., recurso floral associado e data de amostragem.

Espécie (n = 10)	Recurso Floral	Municípios		Data
<i>Bombus morio</i>	<i>Senna macranthera</i>	Santa Maria	29°71'S 53°71'W	Mar 2019
<i>Bombus morio</i>	<i>Jacaranda brasiliana</i>	São Pedro do Sul	29°63'S 54°18'W	Nov 2018
<i>Bombus morio</i>	<i>Lagerstroemia indica</i>	São Sepé	30°15'S 53°58'W	Mar 2019
<i>Bombus morio e</i>	<i>Lagerstroemia indica</i>	Caçapava do Sul	30°51'S 53°48'W	Mar 2019
<i>Bombus pauloensis</i>	<i>Hibiscus syriacus</i>			
<i>Bombus morio e</i>	<i>Senna macranthera</i>	Júlio de Castilhos	29°25'S 53°66'W	Mar 2019
<i>Bombus pauloensis</i>				
<i>Bombus morio</i>	<i>Senna macranthera</i>	Itaara	29°54'S 53°75'W	Mar 2019
<i>Bombus morio</i>	<i>Senna macranthera</i>	Santiago	29°20'S 54°85'W	Abr 2019
<i>Bombus morio</i>	<i>Senna macranthera</i>	Capão do Cipó	28°92'S 54°55'W	Abr 2019

Método QuEChERS

Foi empregado o método QuEChERS modificado visando a extração e determinação multirresíduo de agrotóxicos em amostras de *Bombus* empregando LC-MS/MS e GC-MS/MS.

A água foi purificada com sistema aMilli-Q (Millipore, Molsheim, França).

Na sala de pesagem, pesou-se em balança analítica, 1g da amostra de *Bombus*; os sais, 4g de MgSO_4 e 1 g NaCl ; 2mL de extrato (solvente orgânico da amostra de *Bombus*), 300mg de MgSO_4 , 250mg de C18 e 50mg de PSA. Na parte da extração adicionou-se a amostra, 5mL de ACN (acetonitrila) e 5mL de H_2O ultra pura; 1 min no vórtex; em seguida acrescentou-se 4g de MgSO_4 e 1g de NaCl ; mais 1 min no vórtex; 8 min de centrifugação a 3400 rpm; colocou-se o sobrenadante por 1h no freezer; acrescentou-se 2mL de extrato e os sais; agitou-se por 1 min no vórtex para remover alguns interferentes; e centrifugou-se por 8 min por 6000 rpm a -10°C . Posteriormente, procedeu-se a etapa de limpeza da amostra. Colocou-se 500uL de H_2O , 500uL da amostra de abelhas e 2uL de padrão interno (para controle do equipamento, pois pode não existir material na amostra analisada e com isso, pelo menos o padrão interno tem que ser observado).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Cromatografia

Para determinação de resíduos de agrotóxicos foi utilizado a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida. Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua interação entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária

líquida ou sólida contida em uma coluna, sendo esta aplicada à análise de compostos voláteis ou volatizáveis que sejam termicamente estáveis (COLLINS et al., 2009).

Como a maioria dos compostos não são suficientemente voláteis para ser analisados por Cromatografia Gasosa, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) tem se destacado (SAIBT, 2017). Na HPLC o principal requisito para a análise é a solubilidade dos compostos na fase móvel (líquida) (COLLINS et al., 2009; HARRIS, 2012).

Análise dos dados

Os dados foram analisados de acordo com o método multirresíduo de extração para 119 agrotóxicos, com posterior análise por cromatografia gasosa e líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em série (LC-MS/MS). O método proposto foi aplicado para análise de amostras de *Bombus* na região Central do Rio Grande do Sul, em localidades com confirmação e suspeita de mortalidade de *Apis mellifera* por contaminação de agrotóxicos, principalmente por fipronil.

RESULTADOS

Para os 119 agrotóxicos analisados pelo método QuEChERS modificado e LC-MS/MS e GC-MS/MS, apenas azoxistrobina, acetamiprido e metomil, apresentaram resíduos detectáveis nas amostras analisadas.

Dessas 119 amostras analisadas, em 114, a concentração de agrotóxico obtida foi menor que o limite de detecção (LOD = Limite de detecção do método, do inglês, *Limit of detection*), em 1 amostra foi quantificado resíduo de agrotóxico, porém abaixo do limite de quantificação (LOQ = Limite de quantificação do método, do inglês, *Limit of quantification*), enquanto que em 4 amostras a concentração do agrotóxico foi detectada acima do limite de quantificação do método (Tabela 2).

Foi detectado resíduo de azoxistrobina na concentração menor que $0,005 \text{ mg/kg}^{-1}$, sendo abaixo do limite de quantificação do método (LOQ), para a amostra de *B. morio* coletada no município de Júlio de Castilho-RS (Tabela 2).

Para a amostra de *B. morio* coletada no município de Santiago-RS foi detectado resíduo de acetamiprido na concentração de $0,082 \text{ mg/kg}^{-1}$, assim como também foi detectado resíduo do mesmo agrotóxico na concentração de $0,013 \text{ mg/kg}^{-1}$ para a amostra de *B. morio* coletada no município de Capão do Cipó-RS. Nas amostras de *B. morio* coletadas no município de Santiago-RS

e Capão do Cipó-RS, foi detectado resíduo de metomil na concentração de 0,058 mg/kg⁻¹ e 0,019 mg/kg⁻¹, respectivamente (Tabela 2).

Apesar de ter sido detectada a presença de resíduos de agrotóxicos apenas em *B. morio*, não é possível afirmar que esta espécie seja mais susceptível aos resíduos desses produtos que *B. pauloensis*, uma vez que, a espécie *B. morio* está presente em maior quantidade e mais distribuída no Estado que a espécie *B. pauloensis*, e com isso mais exposta aos poluentes, principalmente os agrotóxicos, durante sua atividade de forrageamento (coleta de pólen e néctar). Mais estudos sobre a presença de resíduos de agrotóxicos em *Bombus* no Rio Grande do Sul são necessários, visto que nessa pesquisa foi abordado a coleta de *Bombus* em apenas 8 municípios. O primeiro passo foi dado, mais é importante dá continuidade a pesquisa para se ter mais embasamentos para afirmar ou negar a influência dos agrotóxicos no desaparecimento de algumas espécies de *Bombus* no Estado.

Simazina	0,008	0,025	n.d.									
Tebuconazol	0,003	0,010	n.d.									
Tebufenozida	0,002	0,005	n.d.									
Tebufempirade	0,002	0,005	n.d.									
Terbutilazina	0,002	0,005	n.d.									
Tetraconazol	0,002	0,005	n.d.									
Tiactoprido	0,002	0,005	n.d.									
Tiametoxam	0,008	0,025	n.d.									
Tiobencarbe	0,002	0,005	n.d.									
Tiodicarbe	0,002	0,005	n.d.									
Tiofanato-metílico	0,002	0,005	n.d.									
Tolcofós-metílico	0,008	0,025	n.d.									
Triazofós	0,002	0,005	n.d.									
Triciclazol	0,003	0,010	n.d.									
Triflumurom	0,002	0,005	n.d.									
Vamidotiona	0,003	0,010	n.d.									

LOD = Limite de detecção do método (do inglês, *Limit of detection*)

LOQ = Limite de quantificação do método (do inglês, *Limit of quantification*)

n.d = Não detectado, ou seja, menor que o limite de detecção.

DISCUSSÃO

O uso dos agrotóxicos é importante para a agricultura principalmente quando se trata de aumento de produtividade, garantindo o controle de insetos pragas e doenças (VEIGA, 2006) que comprometem o desenvolvimento e produção desejada das culturas. Entretanto, muitas dessas práticas agrícolas ocorrem sem o manejo correto colocando em risco a manutenção da biodiversidade de abelhas e perdas de espécies como descrito para a *Apis mellifera* no fenômeno denominado Colony Collapse Disorder (CCD) relatado nos Estados Unidos, onde apicultores chegaram a perder 90% de suas colmeias (ELLIS, 2007).

A Desordem do Colapso das Colônias (no português) está associada ao desaparecimento de abelhas operárias forrageiras, encarregadas de coletar o néctar e o pólen nas flores, e que não retornam às colmeias. Entretanto, as causas ainda não estão definidas, embora esteja associada à intoxicação de abelhas por agrotóxicos, que são cada vez mais utilizados na agricultura moderna. Na pesquisa desenvolvida por SABIT (2017), o método proposto para detecção de resíduos de agrotóxicos aplicado em amostras de pólen apícola e de abelhas *A. mellifera*, obtidas de diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul, todas as amostras apresentaram resíduos de agrotóxicos, porém abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação Europeia.

Segundo MALASPINA et al. (2008), os inseticidas podem afetar as abelhas principalmente por três modos de intoxicação: a) contato; b) ingestão e c) fumigação e, seus efeitos variam de morte causada por toxicidade aguda e efeitos a longo prazo provocando danos no funcionamento da colônia e diminuição da longevidade dos indivíduos. Na Tabela 3 foi observada a toxicidade de contato e a toxicidade oral de alguns agrotóxicos para as abelhas, medida pela dose letal mediana (LD₅₀, do inglês *Lethal Dose*) (BAYO & GOKA, 2016). LD₅₀ corresponde à dose necessária de uma dada substância para matar 50% de uma população.

Tabela 3 – Classe, agrotóxico e suas respectivas toxicidades por contato e oral para as abelhas.

Classe	Agrotóxicos	LD ₅₀ Contato ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LD ₅₀ Oral ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Inseticidas	Carbofurano	0,16	
	Clorpirifós	0,072	0,24
	Clotianidina	0,039	0,004
	Diazinona	0,38	0,21
	Fipronil	0,007	0,001
	Fenpiroximato	11	

	Imidacloprido	0,061	0,013
	Tau-Fluvalinato	8,7	45
Fungicidas	Azoxistrobina	200	25
	Boscalida	200	166
	Carbendazim	50	
	Miclobutanil	40	34
	Propiconazol	50	77
	Tebuconazol	200	8

Fonte: BAYO & GOKA, 2016

Na tabela acima, dos agrotóxicos presentes nas amostras de *Bombus* spp. analisadas na pesquisa, está listado apenas o fungicida Azoxistrobina, no entanto o inseticida Acetamiprido e o inseticida e acaricida Metomil são amplamente utilizados na agricultura para controle dos principais insetos-praga e doenças de diversas culturas de importância agrícola no Rio Grande do Sul.

Em pesquisa desenvolvida por GRADISH et al. (2012), *B. impatiens* foi suscetível a exposição tópica de todos os inseticidas testados, exceto Flubendiamida, que não causou mortalidade na dosagem de até 5000 mg a.i./L, aproximadamente quatro vezes a taxa de aplicação recomendada que é de 525 mg a.i./L, e não representa perigo com contato direto para *B. impatiens*. Enquanto que, com base nos valores LC₅₀, Deltametrina foi o agrotóxico mais tóxico, sendo 6,8, 2,2 e 1,7 vezes mais suscetíveis que o Spinosad, Spinetoram e Phosmet, respectivamente.

Azoxistrobina

A Azoxistrobina (C₂₂H₁₇N₃O₅) é um composto de metoxiacrilato e um fungicida pertencente ao grupo químico estrobilurinas. Sua base de formulação é de compostos antifúngicos de ocorrência natural em cogumelos que se desenvolvem em madeira em decomposição (ANVISA, 2020; MINISTRY OF HEALTH, 2019); trata-se de um fungicida de pós-emergência, sistêmico e de amplo espectro, com atividade contra os quatro maiores grupos de fungos patogênicos (ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos e oomicetos) (MINISTRY OF HEALTH, 2019). Sua ação é de inibição da respiração mitocondrial, aderindo ao citocromo “b”, o que impede a passagem de elétrons dos citocromos “b” para os “c”, e consequentemente interrompe a produção de energia. O resultado é a morte dos microrganismos (BARTLETT et al., 2002).

Este composto é um dos fungicidas mais comercializados em todo o mundo, como substituição aos fungicidas triazólicos; no entanto enfrentam também sérios questionamentos (MINISTRY OF HEALTH, 2019). No Brasil tem uso autorizado pela ANVISA para: (i)

aplicação foliar nas culturas de abacate, abóbora, abobrinha, alface, algodão, alho, amendoim, arroz, aveia, banana, batata, begônia, berinjela, beterraba, café, caju, caqui, cana-de-açúcar, chalota, cebola, cenoura, centeio, cevada, citros, couve-flor, crisântemo, ervilha, eucalipto, feijão, figo, gérbera, girassol, goiaba, kalanchoe, mamão, manga, maracujá, melancia, melão, milho, milheto, morango, nectarina, pepino, pêsego, pimentão, soja, sorgo, tomate, trigo, triticale e uva; (ii) aplicação em sementes de algodão; (iii) e tratamento industrial de propágulos vegetativos (mudas) antes do plantio na cultura de cana-de-açúcar (ANVISA, 2020).

A azoxistrobina aparece na lista de vendas da ANVISA a partir de 2012, oscilando entre a 27ª posição em 2012, 17ª em 2015 (ano em que se registrou a maior venda: 3643 toneladas) e 27ª em 2017. Destaque para região Centro Oeste com 40% das vendas de 2012 a 2017 e, entre os estados, o MT, com 24% (IBAMA, 2018). A azoxistrobina possui baixa solubilidade (6-10 mg/L) (MINISTRY OF HEALTH, 2019) e não é volátil (PPDB, 2019). No solo, apresenta mobilidade moderada à baixa (MINISTRY OF HEALTH, 2019). Porém, exibe degradação muito lenta no solo e em sedimentos - tempo de meia-vida no solo de 279 dias, com 24-42% do composto remanescente após 360 dias; em condições anaeróbias observou-se meia-vida de 181 dias e 25-33% remanescente após 360 dias (MINISTRY OF HEALTH, 2019); tempo de meia-vida nos sedimentos de 205 dias; mas somente 6,1 dias na fase aquática (PPDB, 2019); a 25 °C, em qualquer valor de pH, não há hidrólise significativa.

Diante de vários estudos realizados com a Azoxistrobina e a grande quantidade de vegetais alvos da aplicação deste fungicida, é importante respeitar a época correta de aplicação, momento em que a cultura alvo não esteja no período de florescimento, pois parte dos vegetais são utilizados por abelhas, inclusive as do gênero *Bombus*, para coleta de alimentos, ficando expostos a tal produto.

Acetamiprido

O acetamiprido é um inseticida neonicotinoide de primeira geração, sistêmico que atua por contacto ou ingestão. Seu ingrediente ativo é o acetamiprido (acetamiprid). É um produto para aplicação foliar de diversas culturas (ANVISA, 2017). Dentre os neonicotinoides, destacam-se os produtos, imidacloprido, acetamiprido e tiametoxam. Estes inseticidas são agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) presentes no sistema nervoso central dos insetos. Em estudos comparativos, verificou-se que os neonicotinoides apresentam grande afinidade aos nAChR de insetos do que de vertebrados, sendo menos tóxicos ao

homem, portanto, empregados no manejo de insetos-praga (TOMIZAWA & CASIDA, 2005), tornando-se um dos principais grupos de produtos fitossanitários comercializado no mundo (SPARKS et al., 2015).

Os neonicotinoides geralmente são tóxicos para os insetos em pequenas quantidades quando comparado com outros grupos de inseticidas. Por exemplo, a dose letal 50 (DL50) para a ingestão de imidacloprido e clotianidina para abelhas é 5 e 4 ng por insetos, respectivamente, o que para efeitos de comparação é de aproximadamente 1/10.000 da DL50 para diclorodifeniltricloroetano (SUCHAIL et al., 2000).

De acordo com TAKAHASHI (1992), acetamiprido parece ser mais seguro para as abelhas do gênero *Apis* do que *Bombus*, porém, de uma maneira geral, é considerado mais seguro para as abelhas que os demais representantes dos neonicotinoides. A variação existente é devida, principalmente, à estrutura química dos produtos fitossanitários desse grupo e a afinidade pelos seus respectivos receptores nas abelhas. Por exemplo, os neonicotinoides podem ser divididos em dois grupos: (i) um formado por aqueles que possuem o radical N-nitroguanidina (imidacloprido, tiametoxam, clotianidina e dinotefuram) e (ii) outro com radical N-ciano-amidina (acetamiprido e tiacloprido). Em ambos os casos, esses inseticidas são agonistas do nAChR (ELBERT et al., 2008).

Estudos comparativos entre abelha e moscas mostraram que, em todos os casos, a afinidade do receptor da acetilcolina com acetamiprido é semelhante, sugerindo que a baixa susceptibilidade das abelhas não está relacionada com diferenças nos sítios de ação desses compostos (IWASA et al., 2004). Por outro lado, avaliando somente *Apis mellifera* (LINNEAUS, 1758), IWASA et al. (2004) verificaram que tiametoxam chega a ser 192 vezes mais tóxicos que acetamiprido e tiacloprido, sendo essa variação atribuída ao fator estrutural da molécula e no caso do acetamiprido, durante o processo de metabolismo “in vivo” não gerar compostos tóxicos como ocorre com tiametoxam e imidacloprido (BRUNET et al., 2005).

Porém, de acordo com PEREIRA (2010), o acetamiprido aplicado nas doses que correspondem à DL50 e DL50/10, prejudicou o comportamento de reflexo e extensão da probóscide de *A. mellifera* nos testes realizados 1 e 4 horas após a aplicação do ingrediente ativo, enquanto que, a dose correspondente à DL50 prejudicou a atividade locomotora nesses mesmos períodos, e a dose correspondente à DL50/10 também afetou a atividade locomotora no teste de 4 horas.

Metomil

O metomil é um inseticida e acaricida, altamente tóxico para seres humanos, gado, animais de estimação e animais selvagens. Possui como ingrediente ativo o metomil (methomyl) e grupo químico: metilcarbamato de oxima. É um produto para aplicação foliar nas culturas de algodão, arroz, aveia, batata, brócolis, café, centeio, cevada, couve, dendê, feijão, milheto, milho, repolho, soja, sorgo, tomate, trigo e triticale. E para aplicação pré-plantio nas culturas de milho e soja. Este agrotóxico possui classificação toxicológica classe I (ANVISA, 2019).

Observa-se que o risco dos agrotóxicos metomil, carbaril, clorpirifós, diazinona, dimetoato, ometoato, fentiona, metamidofós, metidationa, monocrotofós para as abelhas é mais elevado para aquelas que procuram alimento até 10 horas depois da pulverização (EICH, 2015). Segundo VALDOVINOS-NÚNEZET et al. (2009), efeitos subletais de doses de metomil e permetrina (0,90 g p.c./ L de H₂O e 0,91 g p.c./ L de H₂O, respectivamente), demonstraram alta suscetibilidade para abelhas indígenas.

De acordo com PIMENTEL & BURGESS (2012) as quantidades de inseticidas aplicadas muitas vezes não atingem o inseto alvo e boa parte do que é aplicado é perdido por deriva, o que aumenta ainda mais problemas com intoxicações a longas distâncias por insetos não alvos. Se tratando de *A. mellifera*, segundo THOMPSON & MAUS (2007), a exposição a doses subletais de inseticidas pode ter uma influência sobre a aprendizagem do inseto, sua capacidade de orientação, forrageamento e na sua prole.

Assim como a azoxistrobina (fungicida sistêmico), que é utilizado para proteger diversos vegetais do ataque de doenças, o acetamiprido (inseticida do grupo dos neonicotinoides) e o metomil (inseticida e acaricida), também são utilizado para proteger uma grande quantidade de vegetais da ação de insetos-pragas e ácaros, e suas aplicações tem que ser evitadas no período de floração, período de maior atividade das abelhas. É importante respeitar as normas para a aplicação de agrotóxicos e o período correto de aplicação. Realizando a utilização de agrotóxicos com segurança, a vida dos insetos benéficos, assim como a dos seres humanos e animais, estarão mais preservada.

No entanto, para VIANA & SILVA (2010) a maior suspeita é que os polinizadores vêm desaparecendo de áreas agrícolas por causa da fragmentação de habitats, grandes áreas de monocultura, desmatamento para intensificar a agricultura e/ou pastagem e, principalmente devido ao uso excessivo ou incorreto de agrotóxicos. E de acordo com os resultados obtidos nas análises de resíduos de agrotóxicos nas amostras de *Bombus* estudadas, a possível causa

da redução populacional de *Bombus* no Rio Grande do Sul não esteja diretamente associada ao uso de agrotóxicos, visto a pouca quantidade de resíduos detectada nas amostras, contudo, estudos mais ampliados são necessários para apoiar tal afirmativa.

CONCLUSÃO

Dos 119 agrotóxicos analisados, apenas azoxistrobina, acetamiprido e metomil, apresentaram resíduos detectáveis nas amostras analisadas, no entanto, a azoxistrobina foi detectada na concentração abaixo do limite de quantificação do método (LOQ) para amostra de *B. morio* coletados no município de Júlio de Castilho, enquanto que foi detectado resíduo de acetamiprido e metomil acima do limite de quantificação do método em amostras também de *B. morio*, coletados nos municípios de Santiago e Capão do Cipó. Nos demais compostos (116), a concentração de agrotóxico obtida foi menor que o limite de detecção do método (LOD). Com isso, a suposta causa da redução populacional ou desaparecimento de abelhas do gênero *Bombus* no Rio Grande do Sul não esteja ligada diretamente a utilização de agrotóxicos nos plantios agrícolas no Estado, e sim pela expansão da agricultura e desmatamento que reduzem os locais propícios para nidificação, assim como os recursos florais utilizados por esses polinizadores.

Contribuição dos autores

JGS (autora principal) e JGS coletaram material em campo; JGS (autora principal) redigiu o manuscrito; RZ realizou as análises de resíduos de agrotóxicos em *B. morio* e *B. pauloensis* e JGS revisou criticamente o manuscrito.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Renato Zanella, coordenador do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas (LARP), do Setor de Química Analítica, Departamento de Química, da Universidade de Santa Maria-RS, por permitir a realização da análise de multirresíduo de agrotóxico em abelhas do gênero *Bombus* no LARP.

REFERÊNCIAS

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/A29%2B%2BAcetamiprido.pdf/2b262563-b2e3-442c-9f86-4334aa0aa2c5>> Acesso em: 23 out 2020.

ANVISA. **AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. 2019. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/M17+%E2%80%93+Metomil/35b28b22-55bc-4088-8c0e-946684ffcb98>> Acesso em: 23 out 2020.

ANVISA. **AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA**. 2020. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/A26%2B%2BAzoxistrobina.pdf/6b3c8202-7ef3-47be-8a04-5f60e380bbd1>> Acesso em: 23 out 2020.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; BENNEVEAU, A.; GÉRET, F.; DELATTE, H.; BECKER, N.; BRUNET, J. L.; REYNAUD, B.; BELZUNCES, L. P.. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. **Environ Int**, v.60, p.31-41, 2013.

BARTLETT, D.; CLOUGH, J.; GODWIN, J.; HALL, A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B.. Review: the strobilurin fungicides. **Pest management Science**. v. 58, p.649-662, 2002.

BAYO, S. F.; GOKA, K.. Impacts of Pesticides on Honey Bees. **Beekeeping and Bee Conservation**, p.78-97, 2016.

BREEZE, T. D.; BAILEY, A. P.; BALCOMBE, K. G.; POTTS S. G.. Pollination services in the UK: How important are honeybees? **Agr Ecosyst Environ**, v.142, p.137-143, 2011.

BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P.. In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Pest Management Science**, Sussex, v.61, p.742-748, 2005.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, O. S.. **Fundamentos de Cromatografia**, 2 ed, Unicamp: Campinas, cap: 8 e 9, 2009.

COLIN, M. E.; BELZUNCES, L. P.. Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *Apis mellifera* L. - A convenient biological approach. **Pestic Sci**, v.36, p.115-119, 1998.

EICH, A. P. P.. **Histórico de uso e ação de agroquímicos sobre abelhas da espécie *Apis mellifera***. Dissertação (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pampa, São Gabriel, 2015.

ELBERT, A; HAA, M; SPRINGER, B; THIELERT, W; NAUEN, R. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, Sussex, v.64, p.1099-1105, 2008.

ELLIS, A.. **Colony Collapse Disorder (CCD) in Honey Bees**. Department of Entomology and Nematology, UF/IFAS Extension. Original publication date May 2007. Revised July 2010, September 2013, and December 2016. 2007, Visit the EDIS website at <http://edis.ifas.ufl.edu>.

FERRER, I.; THURMAN, E. M. J.; CHROMATOGR A.. **Multi-residue method for the analysis of 101 pesticides and their degradates in food and water samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry**. Dec 14, v.1175, n.1, p.24-37. Epub 2007 Oct 17, 2007.

GRADISH, A. E.; SCOTT-DUPREE, C.D.; FREWIN, A.J.; CUTLER, G.C.. Lethal and sublethal effects of some insecticides recommended for wild blueberry on the pollinator *Bombus impatiens*. **The Canadian Entomologist**, v.144, n.3, p.478–486, 2012.

HARRIS, D. C.. **Análise Química Quantitativa**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

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

MALASPINA, O.; SOUZA, T. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; CRUZ, A. S.; JESUS, D.. **Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil**. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, Ribeirão Preto: FUNPEC, Universidade de São Paulo, p. 41–48, 2008.

MINISTRY OF HEALTH.. **Guidelines for drinking-water quality management for New Zealand (2nd edn)**. Volume 3. Datasheets. Part 2.3. Chemical and physical determinands. Pesticides. Wellington: Ministry of Health, 2019. Disponível em: <http://www.health.govt.nz/publication/guidelines-drinking-water-quality-management-new-zealand>. Acesso em 25 abr. 2020.

PARADIS, D.; BÉRAIL, G.; BONMATIN, J. M.; BELZUNCES, L. P.. Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. **Anal Bioanal Chem**, v.406, p.621-633, 2014.

PEREIRA, A. M..**Efeitos de inseticidas na sobrevivência e no comportamento de abelhas**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.

PIMENTEL, D.; BURGESS, M.. Small amounts of Pesticides Reaching Target Insects. **Environment, Development and Sustainability**, v.14, p.1–2, 2012.

POTTS, S.G.; ROBERTS, S. P. M.; DEAN, R.; MARRIS, G.; BROWN, M. A.; JONES, R.; NEUMANN, P.; SETTELE, J.. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. **J Apic Res**, v.49, p.15-22, 2010.

PPDB - PESTICIDE PROPERTIES DATABASE. **Azoxystrobin**. University of Hertfordshire, 2019. Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/54.htm>>. Acesso em: 01 abr. 2020.

SAIBT, N.. **Determinação Multirresíduo de Agrotóxicos em Abelha e Pólen Apícola Empregando Método Quechers Modificado e LC-MS/MS**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

SPARKS, T. C.; NAUEN, R.. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.121, p.122-128, 2015.

SUCHAIL, S. G; GUEZ, D; BELZUNCES, L. P.. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology Chemistry*, v.19, p.1901- 1905, 2000.

TAKAHASHI, H; MITSUI, J; TAKAKUSA, N; MASTUDA, M; YONEDA, H; SUZUKI, J; ISHIMITSU, K; KISHIMOTO, T.. Takahashi, H., Mitsui, J., Takakusa, N. 25, a new type of systemic and broad spectrum insecticide. Brighton Crop Protection Conference, Brighton, UK. **Pests and Diseases**, v.1, 1992.

THOMPSON, H. M.; MAUS, C.. The Relevance of Sublethal Effects in Honey Bee Testing for Pesticide Risk Assessment. **Pest Management Science**, v.63, p.1058–1061, 2007.

TOMIZAWA, M; CASIDA, J. E.. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of Selective Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v.45, p.247-268, 2005.

VALDOVINOS-NÚÑEZ, G. R.. Comparative Toxicity of Pesticides to Stingless Bess (Hymenoptera: Apidae: Meliponine). **Journal of Economic Entomology**, Gainesville, v.102, n.5, p.1737-1742, 2009.

VAN DER SLUIJS, J. P.; SIMON-DELISO, N.; GOULSON, D.; MAXIM, L.; BONMATIN, J. M.; BELZUNCES, L. P.. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. **Curr Opin Environ Sustain**, 2013.

VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIEM FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHENY UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S.. Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. **PLoS One**, v.4, n.8, 2009. doi: 10.1371 / journal.pone.0006481.

VEIGA, M. M.. Análise da contaminação dos sistemas híbridos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do sudeste do Brasil. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 2391-2399, 2006.

VIANA, B. F.; SILVA, F. O.. **Polinização por abelhas em agroecossistemas**. 2010.

Disponível

em:

<http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/16%C2%BA20Cong_Bras_Apic/Anais_1/POLINIZA%C3%87%C3%83O%20POR%20ABELHAS%20EM%20AGROECOSSISTEMAS.pdf>. Acesso em: 20 out 2019.

ZANELLA, R.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; MARTINS, M. L.. **Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos**. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, cap 24, 2015.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o período de coletas em campo foram identificadas apenas duas espécies de *Bombus* (*B. morio* e *B. pauloensis*) em 32 municípios amostrados. As espécies estão amplamente distribuídas no Rio Grande do Sul, ocupando todos os biomas que compõem o Estado. As espécies coletadas estavam associadas a 16 espécies de plantas pertencentes a 11 famílias botânicas. Foram identificados 54 tipos polínicos de plantas associadas às duas espécies de *Bombus*, pertencentes 98% a plantas e ervas nativas, demonstrando preferência em polinizar plantas nativas.

A espécie *B. morio* está mais distribuída e presente em maior quantidade no Estado quando comparada à espécie *B. pauloensis*, com isso, *B. morio* está mais exposta a poluentes durante seu forrageamento, principalmente aos agrotóxicos utilizados na proteção das lavouras, especialmente de soja. Fato este, que pode justificar ter sido detectada a presença de resíduos de agrotóxicos apenas na espécie *B. morio*. Na avaliação de resíduos de agrotóxicos nos exemplares de *Bombus* estudados, foi detectada a presença apenas de três agrotóxicos (azoxistrobina, acetamiprido e metomil) dos 119 produtos analisados.

Diante da pesquisa realizada, ainda não é possível afirmar que a espécie *B. morio* seja mais susceptível ao contato com resíduos de agrotóxicos que a espécie *B. pauloensis* ou que esta, tenha sido a causa do desaparecimento de algumas espécies de *Bombus* no Estado. Mas, acredita-se que as espécies de *Bombus* presentes no Rio Grande do Sul não estejam em processo de desaparecimento e/ou redução populacional devido ao manejo incorreto de agrotóxicos nas lavouras, e sim pelas ações antrópicas que resultam na redução das florestas, aliado ao processo de intensificação de áreas agrícolas para plantio de monoculturas, que reduzem os locais propícios para a construção de ninhos das abelhas do gênero *Bombus*, uma vez que, em condições normais, constroem seus ninhos exclusivamente no chão, e diminuem os recursos florais (pólen e néctar) disponíveis para esses polinizadores.