UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“Efeitos da exposição de *Bombus terrestris audax*, *Apis mellifera carnica* e *Scaptotrigona bipunctata* ao neonicotinóide tiametoxam e uso de *Scaptotrigona* aff. *depilis* como bioindicador”.

ANNELISE DE SOUZA ROSA

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: ENTOMOLOGIA

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

VERSÃO CORRIGIDA

ANNELISE DE SOUZA ROSA

“Efeitos da exposição de *Bombus terrestris audax*, *Apis mellifera carnica* e *Scaptotrigona bipunctata* ao neonicotinóide tiametoxam e uso de *Scaptotrigona aff. depilis* como bioindicador”.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: ENTOMOLOGIA

Orientadora: Prof. (a) Dr. (a) Vera Lucia Imperatriz-Fonseca
Coorientadora: Dr. (a) Carmen Sílvia Soares Pires

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

DEDICO ESTA TESE AOS MEUS PAIS, IONE ROSA E RONALDO

ROSA,

E AO MEU AMOR, LUCAS FONTANA

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido a oportunidade de desenvolver esse trabalho;

Aos meus pais, cuja lista de agradecimentos não caberia aqui. Ione Rosa e Ronaldo Rosa, eu amo vocês por tudo o que fizeram e fazem por mim sempre, e por terem me dado apoio em todos os momentos dessa caminhada, especialmente naqueles mais difíceis, mesmo com a distância física. Sem vocês, eu nunca teria chegado aonde cheguei. Muito obrigada!

Ao meu noivo, Lucas Fontana, cuja lista de agradecimentos também não caberia aqui. Obrigada, primeiramente, por me amar e fazer parte da minha vida; por ter me incentivado e me apoiado em todos os momentos de dificuldades; por ter aceitado a distância física, porém nunca a espiritual, que tivemos de suportar, em decorrência da execução desse trabalho. Eu te amo!

Aos meus amados afilhados (Dante Schattschneider e Anita Soares) e sobrinho (Bento Costa), por terem me proporcionado muitas alegrias, mesmo quando distantes, via Skype;

A toda minha família, pelas orações, torcida e apoio, especialmente aos meus avós Dalva Rosa e Cassal Souza, à minha querida dinda Iára Souza e às minhas primas Raquel Corrêa e Márcia Bianchi;

Agradeço com um carinho muito especial à minha amada Avó Geni da Costa Souza que, agora de outro plano, esteve ao meu lado em todos os momentos, especialmente naqueles mais difíceis;

À Dra. Vera Lúcia Imperatriz-Fonseca, por ter aceitado me orientar, e pelos seus ensinamentos sempre muito importantes durante a execução desse trabalho;

À Dra. Betina Blochtein, que considero como minha “mãe acadêmica”: em 2003 me recebeu em seu laboratório para a realização de estágio voluntário, pesquisa de iniciação científica, seguidos de orientação de mestrado, e até hoje me acompanha com importantes ensinamentos. Muito obrigada!

À Dra. Carmen Sílvia Soares Pires, pela coorientação;

Ao Dr. James Cresswell, pela excelente receptividade em seu laboratório e supervisão do meu trabalho durante o estágio na Inglaterra;

À Barbara Blackmore e Steve Blackmore, pelo carinho e receptividade em sua casa, durante o estágio na Inglaterra;

Ao Dr. Carlos Alberto Garófalo, pelo apoio, amizade e por suas sábias palavras sempre muito pertinentes;

Aos meus amigos Juliana Teixeira, Elisa Queiróz e Tiago Lopes, pelas revisões de textos, pelo carinho e pelas palavras de incentivo que foram extremamente importantes, especialmente nos últimos dias que antecederam a entrega dessa tese. Sem vocês, a conclusão desse trabalho teria sido muito mais difícil. Muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Entomologia da USP-FFCLRP, especialmente à Maria Juliana Caliman, pelo apoio em experimentos e na revisão de textos; à Morgana Sazam, pelo apoio em coletas; ao Ayrton Vollet-Neto, pelo apoio quanto às técnicas de criação *in vitro*; à Gabriele Freiria, Leo Rocha, Kátia Paula Aleixo e Patrícia Vilhena, pelos momentos de diversão;

Às amigas e colegas de trabalho da PUCRS, Mariana Zaniol Fernandes e Daniela Loose Ferreira, pelo apoio na parte inicial desse trabalho;

À Universidade de São Paulo e à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pela concessão de espaço para a execução dessa pesquisa;

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro;

A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO:

A perda de polinizadores no mundo todo, especialmente abelhas, tem sido atribuída, entre outros fatores, à intensificação do uso de inseticidas em agro ecossistemas. A nova classe química de inseticidas, os neonicotinóides, tem sido o principal alvo de investigações, sobretudo em decorrência de sua ação sistêmica que transloca a substância ativa pela planta e atinge o pólen e néctar como resíduos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos do neonicotinóide tiametoxam em abelhas sociais e avaliar a possibilidade da espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis* ser utilizada como bioindicadora de contaminação ambiental por inseticidas. Para tanto, (i) operárias forrageiras de *Bombus terrestris audax*, *Apis mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata* foram submetidas à exposição contínua de alimento contaminado; (ii) operárias de *Scaptotrigona* aff. *depilis* foram expostas ao inseticida, durante o estágio larval, através do alimento e; (iii) operárias forrageiras de *Scaptotrigona* aff. *depilis* foram coletadas no meliponário da Universidade de São Paulo e arredores, e submetidas a análises químicas, para a checagem de contaminação pelos neonicotinóides tiametoxam e/ ou imidacloprido. (i) Dentre as três espécies de abelhas sociais adultas, *B. terrestris audax* mostrou ser a mais sensível à ação de tiametoxam, seguida de *S. bipunctata* e *A. mellifera*, verificados através do decréscimo no consumo de alimento e da longevidade. Nesse sentido, os efeitos subletais não foram influenciados pelo tamanho do corpo dos indivíduos. (ii) As operárias de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, quando expostas a doses do inseticida em fase larval, apresentaram desenvolvimento tardio e originaram indivíduos menores e assimétricos. Tanto em abelhas adultas como em imaturas, os efeitos subletais foram evidenciados nos indivíduos expostos às maiores doses de tiametoxam nos experimentos (39.37 e 98.43µg de substância ativa/kg de xarope em adultos, ou 0.044 e 4.375ng de substância ativa/larva). (iii) A detecção de

tiametoxam e imidacloprido em operárias forrageiras de *Scaptotrigona* aff. *depilis* permitiu considerar essa espécie como bioindicadora de contaminação. Nesse estudo, a mortalidade não foi parâmetro conclusivo quanto aos potenciais efeitos adversos de tiametoxam para as abelhas. O potencial de *Scaptotrigona* aff. *depilis* como espécie bioindicadora é uma importante etapa para avaliar a contaminação ambiental por neonicotinóides em abelhas sem ferrão, podendo ser utilizada em políticas públicas.

Palavras-chave: Abelhas sociais, Meliponini, Bombini, Apini, efeitos subletais, polinizadores, resíduos, tiametoxam.

ABSTRACT:

Pollinator losses all over the world, especially bees disappearing, have been attributed, among others, to the intensification of insecticide use on crops. The new chemical class of insecticides, the neonicotinoids, has been the main target of investigation, mainly due to its systemic action, which translocates the active substance for the plant and to reach the pollen and nectar as residues. Thus, this study evaluated the effects of thiamethoxam neonicotinoid on bees and the possibility of the use of *Scaptotrigona* aff. *depilis* species as bioindicator of environmental contamination by insecticides. For this, (i) *Bombus terrestris audax*, *Apis mellifera* and *Scaptotrigona bipunctata* forager workers were induced to continue exposure of contaminated food; (ii) *Scaptotrigona* aff. *depilis* workers were exposed to the insecticide, during its larval phase, through the larval food and; (iii) *Scaptotrigona* aff. *depilis* forager workers were collected from University of São Paulo meliponary and surroundings and analyzed, in order to check for contamination by thiamethoxam and/ or imidacloprid neonicotinoids. (i) Among the three social bee species, *B. terrestris audax* showed to be more sensible to the thiamethoxam action, followed by *S. bipunctata* and *A. mellifera*, verified through decreasing food consumption and longevity. Thus, the sub lethal effects were not influenced by individual body size. (ii) *Scaptotrigona* aff. *depilis* workers, when exposed to insecticide doses on larval food, caused individuals with developmental delay and were smaller and asymmetric. Both adult bees and in immature, the sub lethal effects of thiamethoxam were evidenced on individuals exposed to the highest doses in the experiments. (iii) The detection of thiamethoxam and imidacloprid in *Scaptotrigona* aff. *depilis* forager workers allowed to consider this species as bioindicator of environmental contamination. In this study, the mortality was not a conclusive parameter as to the potential adverse effects of thiamethoxam for the bees. The potential

of *Scaptotrigona* aff. *depilis* species as bioindicator is an important step to assess environmental contamination by neonicotinoids on stingless bees, may be used for public policy.

Keywords: Social bees, Meliponini, Bombini, Apini, sub lethal effects, pollinators, residues, thiamethoxam.

Índice

Resumo	i
Abstract	iii
Objetivos e organização geral da tese	1
Capítulo 1. Introdução geral: O uso de pesticidas e suas potenciais consequências para populações de abelhas	2
Capítulo 2. Resíduos do neonicotinóide tiametoxam causam danos em abelhas eussociais?	20
Introdução	21
Material e Métodos	23
Resultados	25
Discussão	30
Referências	37
Capítulo 3. O consumo do neonicotinóide tiametoxam durante a fase larval interfere no desenvolvimento da espécie de abelha sem ferrão <i>Scaptotrigona aff. depilis</i>?	45
Introdução	46
Material e Métodos	49
Resultados	54
Discussão	68
Referências	73
Capítulo 4. Abelhas sem ferrão como potenciais indicadores de contaminação ambiental por pesticidas	83
Introdução	84
Material e Métodos	86
Resultados	92
Discussão	102
Referências	106
Capítulo 5. Considerações finais e potenciais alternativas mitigatórias para efeitos de neonicotinóides em abelhas, com ênfase em abelhas sem ferrão	114

OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

Com base na atual preocupação mundial quanto à utilização de inseticidas neonicotinóides e nas evidências de riscos que apresentam para populações de abelhas, a presente pesquisa tem como objetivos principais: (i) verificar os efeitos do neonicotinóide tiametoxam em abelhas sociais; (ii) avaliar a possibilidade da espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis* ser utilizada como bioindicadora de cotaminação ambiental por inseticidas.

A tese será apresentada em cinco capítulos. O primeiro se trata de um capítulo introdutório que apresenta um panorama geral do uso de inseticidas e seu impacto sobre populações de abelhas.

O segundo testa a hipótese de que o consumo de alimento contaminado com o tiametoxam durante a fase larval retarda o desenvolvimento de imaturos, aumenta a taxa de mortalidade e origina indivíduos de tamanho menor e assimétricos, na espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona* aff. *depilis*.

O terceiro capítulo testa a hipótese de que a exposição oral ao tiametoxam diminui o consumo de alimento e a longevidade de operárias forrageiras das três tribos de abelhas eussociais: *Bombus terrestris audax* (Bombini), *Apis mellifera* (Apini) e *Scaptotrigona bipunctata* (Meliponini).

O quarto capítulo aborda a contaminação de abelhas provenientes do meliponário da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto, com os neonicotinóides imidacloprido e tiametoxam.

O quinto e último capítulo se trata de um fechamento do tema apresentado nessa tese, indicando algumas etapas iniciais importantes para a mitigação das implicações de neonicotinóides em abelhas sem ferrão.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

**O USO DE PESTICIDAS E SUAS POTENCIAIS
CONSEQUÊNCIAS PARA POPULAÇÕES DE
ABELHAS**

ANNELISE DE SOUZA ROSA E VERA LUCIA IMPERATRIZ-FONSECA

O USO DE PESTICIDAS E SUAS POTENCIAIS CONSEQUÊNCIAS PARA POPULAÇÕES DE ABELHAS

1. DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E SÍTIOS DE AÇÃO DOS PESTICIDAS, COM ÊNFASE EM INSETICIDAS.

Pesticidas são todas as substâncias ou misturas que têm como objetivo impedir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga (United States Environmental Protection Agency, 2006). São classificados de acordo com os organismos-alvo, sendo os fungicidas, os herbicidas e os inseticidas os mais comumente utilizados e os principais focos de estudos (Köhler & Triebskorn, 2013). Os principais grupos químicos dos inseticidas de ação neurotóxica, seus respectivos sítios de ação e os principais efeitos sobre abelhas estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1. Principais grupos químicos de inseticidas, sítios de ação e os principais efeitos que causam em abelhas. As informações foram sumarizadas a partir dos dados apresentados por AGROFIT (2014); Freitas & Pinheiro (2010).

Grupo químico		Sítio de ação	Principais efeitos sobre abelhas
Carbamatos	Cloridrato de probapocarbe, iprovalicarbe e oxamyl.	Inibidores de acetilcolinesterase	<ul style="list-style-type: none"> - Forrageamento precoce (MacKenzie & Winston, 1989); - Redução na sobrevivência da prole (Stoner et al., 1985); - Decréscimo na produção de favo e na postura de ovos (Waller et al., 1979); - Emergência de adultos com asas pequenas e deformadas (Atkins & Kellum, 1986).
Organofosforados	Acefato, cadusafós, clorpirifós, diazinona, dimetoato, dissulfotom, etiona, etoprofós, fenamifós e fenitrotona.		
Piretróides	Acrinatrina, aletrina, alfa-cipermetrina, beta-ciflutrina, beta-cipermetrina, bifentrina, ciflutrina, cipermetrina, d-aletrina e deltametrina.	Moduladores de canais de sódio	<ul style="list-style-type: none"> - Perda de memória (Mamood & Waller, 1990); - Desorientação (Vandame et al., 1995); - Decréscimo do forrageamento (Le Blanc, 1985); - Redução na postura de ovos (Tasei et al., 2000); - Repelência às flores (Rieth & Levin, 1988; Shires et al., 1984).
Neonicotinóides	Acetamiprido, clotianidina, dinotefuram, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam.	Agonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina	<ul style="list-style-type: none"> - Perda de memória (Decourtye et al., 1999); - Decréscimo na produção de prole (Tasei et al., 2000).

2. PESTICIDAS E POLINIZADORES

A intensificação da utilização de pesticidas em agro ecossistemas tem sido uma das maiores preocupações mundiais em relação aos riscos que oferecem para populações de abelhas (Suryanarayanan & Kleinman, 2013; Sanchez-Bayo & Goka, 2014). A perda da biodiversidade de polinizadores se torna uma ameaça aos serviços ecossistêmicos por eles prestados (Brown & Paxton, 2009, De La Rúa et al., 2009). A polinização é essencial para a reprodução de plantas silvestres (Meffe, 1998; Brosi & Briggs, 2014), bem como para o aumento na produção de frutos e sementes de cultivos agrícolas que alimentam o mundo (Kremen et al., 2002; Klein et al., 2007; Kremen et al., 2007). Brittain e Potts (2011) advertem que o impacto de uma redução nos serviços de polinização pode variar de efeitos não detectáveis até a redução na reprodução e consequente extinção de espécies de plantas.

Köhler & Triebkorn (2013) reportam o crescente interesse pelos efeitos do uso de inseticidas organofosforados, piretróides e da nova classe neonicotinóides, em populações silvestres, incluindo abelhas. Freitas e Pinheiro (2012) enfatizam a importância do conhecimento sobre as formas de ação dos inseticidas sobre os polinizadores, abelhas em particular, e de usá-los de maneira que venham a minimizar a exposição destes aos defensivos agrícolas, reduzindo os efeitos letais e subletais sobre os polinizadores.

3. SENSIBILIDADE DE ABELHAS A PESTICIDAS

Arena e Sgolastra (2014), em estudo de meta-análise, compararam a sensibilidade de *Apis mellifera* com outras dezenove espécies de abelhas. Considerando todas as espécies e pesticidas avaliados, com base nas DL₅₀ e CL₅₀

(ver detalhes no item 4), o estudo apontou grande variação do raio total de sensibilidade mensurado entre os casos, e a estatística adotada indicou *A. mellifera* como frequentemente mais sensível do que as outras espécies. No entanto, considerando-se as seis classes químicas de inseticidas averiguadas (carbamatos, organoclorados, organofosfatados, piretróides, neonicotinóides e miscelânea), apenas para neonicotinóides todas as outras espécies foram mais sensíveis do que *A. mellifera*. Hardstone e Scott (2010), comparando a susceptibilidade da mesma espécie de abelha a outros insetos, considerando as mesmas classes de inseticidas, apontaram que as outras espécies se mostraram mais sensíveis do que *A. mellifera*.

Brittain e Potts (2011) acrescentam que a sensibilidade entre os diferentes grupos de abelhas a pesticidas irá depender de uma série de fatores, como por exemplo, o tamanho do corpo, a socialidade, o período de voo, o voltinismo, a especialização floral e comportamento do ninho. Nesse contexto, os mesmos autores enfatizam a importância da correlação entre as características apresentadas por cada grupo de abelha e as condições ambientais oferecidas. Por exemplo, o conhecimento da duração da atividade de forrageio de uma abelha e o período de floração de determinada planta, possibilitará a apresentação de indícios quanto aos riscos da exposição e consequente susceptibilidade para cada espécie de abelha.

4. AVALIAÇÕES DE TOXICIDADE

Estudos de toxicidade comumente expressam os resultados através da DL_{50} e/ou CL_{50} (dose e concentração letais que matam 50% de uma população, respectivamente). A DL_{50} é geralmente expressa em μg de ingrediente ativo/abelha e a CL_{50} em μg de ingrediente ativo/kg (pólen e/ou néctar) ou ppb

(parts per billion) (Goulson, 2013; Arena & Sgolastra, 2014). Esses resultados provêm de testes de toxicidade aguda e/ou crônica (Suchail et al., 2001; Iwasa et al., 2004; Valdovinos Nuñez et al., 2009; Cresswell, 2011). No primeiro caso, o indivíduo é exposto de uma única vez a uma dosagem de determinada substância e os efeitos adversos são detectados em um curto intervalo de tempo (até 72 horas). No segundo, o indivíduo é exposto gradualmente a dosagens, em períodos de até 10 dias, e os sintomas são observados ao longo do tempo.

Para Carreck e Ratnieks (no prelo), testes de toxicidade desenvolvidos em laboratório são importantes, mas para refletir as condições de campo, a utilização de doses apropriadas é essencial. Os autores destacam que três fatores vêm sendo superestimados na condução desses tipos de testes: a concentração das substâncias a serem avaliadas, as quais, no caso dos neonicotinóides variam amplamente, especialmente em decorrência de sua ação sistêmica; a duração da exposição, na qual os efeitos de uma mesma dose administrada de uma só vez (exposição aguda) ou gradualmente a longo de um período de tempo (exposição crônica) podem diferir amplamente, sendo o primeiro caso o principal fornecedor de resultados superestimados; e a possibilidade de escolha das flores pelas abelhas, cujos estudos têm assumido que uma colônia de abelha visitaria apenas uma única cultura alvo.

5. IMPLICAÇÕES QUANTO AOS EFEITOS LETAIS E SUBLETAIS DOS PESTICIDAS SOBRE AS ABELHAS

Köhler e Triebkorn (2013) analisaram a ação neurotóxica dos pesticidas em nível individual de insetos para incidentes de mortalidade (efeitos letais) ou para uma série de adversidades que trariam consequências desastrosas em nível

populacional e seriam observadas em longo prazo (efeitos subletais). Nesse contexto, a alteração no comportamento de abelhas e a perda de memória (Desneux et al., 2007), induziriam a implicações nos serviços de polinização, diminuindo a eficiência polinizadora desses insetos (Feltham et al., 2014). Estudos tem evidenciado que essas alterações comportamentais e de memória diminuem o sucesso reprodutivo das abelhas (Laycok et al., 2012; Whitehorn et al., 2012; Fauser-Misslin et al., 2014) e sua capacidade de retornarem às colônias (Gill et al., 2012; Henry et al., 2012), respectivamente.

Além disso, Brittain e Potts (2011) acrescentam que, muitas vezes, os efeitos subletais decorrentes da contaminação por pesticidas podem ser mais prejudiciais às colônias em longo prazo do que os efeitos letais, observados diretamente.

6. PESTICIDAS E SAÚDE DE ABELHAS

Wu et al. (2011) reportam uma série de consequências adversas a serem observadas em longo prazo, em decorrência da exposição de indivíduos de *A. mellifera* a inseticidas, em sua fase imatura. Os autores advertem que o desenvolvimento tardio dos indivíduos, pode ocasionar sérias consequências para a colônia como um todo, trazendo implicações quanto ao desempenho das tarefas executadas pelas abelhas, em diferentes idades. Por exemplo, o decréscimo no número esperado de forrageiras em uma colônia com bom funcionamento, em decorrência do atraso do desenvolvimento das crias, pode conduzir à antecipação da atividade de forrageio de operárias. Essa ocorrência traria prejuízos tanto para as abelhas quanto para as plantas, como por exemplo, a implicação na coleta de recursos alimentares e a ineficiência polinizadora, respectivamente.

Essas e outras evidências, podem ainda conduzir a consequências mais graves. A exposição de abelhas da espécie *A. mellifera* a pesticidas enfraquece as colônias, tornando-as mais suscetíveis a infecções, como ao patógeno *Nosema* (Alaux et al., 2010; Pettis et al., 2012; Pettis et al., 2013). Di Prisco et al. (2013) reportaram que a clotianidina, um dos metabólitos do neonicotinóide tiametoxam é tóxica para a espécie *A. mellifera*, promovendo a replicação de um patógeno viral que deforma as asas e induz a infecções não detectadas facilmente. Além disso, Fauser-Misslin et al. (2014) demonstraram a relevância que a interação da exposição a inseticidas neonicotinóides com a infecção pelo parasita *Crithidia bombi* implica adversamente para colônias de *Bombus terrestris*.

Pettis et al. (2012) alertam para o fato de que as interações entre pesticidas e patógenos poderiam ser as principais causadoras do aumento da mortalidade de colônias de abelhas dessa espécie, incluindo a síndrome “Colony Collapse Disorder” e outros declínios de polinizadores em todo o mundo.

7. NEONICOTINÓIDES

Inseticidas neonicotinóides foram desenvolvidos nos anos 90, são registrados para uso em uma ampla variedade de culturas e eficazes, contra insetos sugadores, tais como besouros e alguns Lepidoptera (Fairbrother et al., 2014). O atual declínio de polinizadores vem sendo atribuído, pelo menos em parte, ao uso de neonicotinóides em cultivos agrícolas que ofertam flores atrativas para abelhas (Brittain & Potts, 2011; Whitehorn et al., 2012; Godfray et al., 2014). Os neonicotinóides são aplicados via pulverização foliar, irrigações no solo e/ou tratamento de sementes (Thompson, 2010; Blacquière et al., 2012). Globalmente,

a aplicação predominante tem sido através das sementes em culturas como algodão, canola e girassol (Jeschke et al., 2010).

Através da sua ação neurotóxica os neonicotinóides atuam na neurofisiologia de insetos, incluindo aqueles não alvos, tais como abelhas (Desneux et al., 2007). Tiametoxam faz parte dessa nova geração de inseticidas e sua comercialização vem sendo crescente no mundo (Maienfisch et al., 2001). De acordo com Maienfisch et al. (2001), a ação agonística nos receptores nicotínicos mimetiza a acetilcolina em seus sítios de encaixe, causando efeitos subletais como perda de memória e orientação (Van der Sluijs et al., 2013). Pettis et al. (2013) acrescentam que esses efeitos a longo prazo podem ocasionar a morte dos indivíduos ou tornar a colônia mais suscetível a doenças.

8. INSETICIDAS NEONICOTINÓIDES: COMO PODEM AFETAR AS ABELHAS?

A ação sistêmica dos neonicotinóides, segundo Blacquièrre et al. (2012), faz com que o ingrediente ativo seja deslocado por todas as partes da planta atingindo o pólen e o néctar, podendo ser detectado como traços residuais. Os mesmos autores destacam que, mesmo em níveis baixos e sem efeitos letais significativos, nos cultivos tratados com inseticidas sistêmicos ofertando flores que contenham pólen e néctar contaminados, o risco de exposição para abelhas deve ser considerado, uma vez que evidências consistentes apontam efeitos subletais, quando expostas a doses reais de campo (Cresswell, 2011; Goulson, 2013).

Assim, a rota de exposição das abelhas ocorre através da dieta, pela ingestão desses recursos que são levados para dentro das colônias pelas operárias

forrageiras (Fairbrother et al., 2014). Em acréscimo, Girolami et al. (2009) destacam o orvalho nas folhas das plantas como uma importante rota de contaminação, cujos resíduos de neonicotinóides também atingem.

As rotas de exposição de abelhas decorrentes da aplicação foliar, além da dieta, incluem também o contato externo do corpo com as substâncias. O contato com os compostos nas folhas pode ser proveniente da própria aplicação na planta ou pela poeira proveniente de sementes tratadas, durante o plantio (Fairbrother et al., 2014).

9. SITUAÇÃO DOS NEONICOTINÓIDES NO BRASIL E NO MUNDO

Mundialmente, é crescente a utilização dessa nova classe de inseticidas em cultivos que ofertam flores atrativas para abelhas (Blacquièrre et al., 2012). Nesse contexto, a perda de populações de abelhas em diversas partes do mundo tem sido alvo de inúmeras especulações e atribuída, pelo menos parcialmente, ao uso de inseticidas neonicotinóides (Godfray et al., 2014). Em evidência na literatura desde 2006, a síndrome denominada “Colony Collapse Disorder” intensificou a busca por respostas quanto ao desaparecimento de abelhas e agravou as atribuições do uso de neonicotinóides a essas ocorrências. A síndrome “Colony Collapse Disorder” ou Desordem do Colapso da Colônia foi primeiramente constatado em colônias de *A. mellifera* e é caracterizado pelo desaparecimento repentino de operárias forrageiras, enquanto que a rainha e as crias permanecem vivas nas colônias (Fairbrother et al., 2014).

No Brasil, a aplicação foliar de inseticidas neonicotinóides, nas sementes e/ ou no solo, é permitida e indicada para diversas culturas, incluindo algodão, citros, tomate, eucalipto, girassol, maçã e morango, as quais ofertam flores

atrativas para abelhas. Os produtos devem vir acompanhados de informações como a indicação de não aplicação em períodos de floração, dos limites de aplicação e respectivos intervalos de segurança (AGROFIT, 2014). Em 2012, após o uma sequência de protestos na Europa com a finalidade de banir toda e qualquer forma de aplicação dos neonicotinóides imidacloprido, tiametoxam e clotianidina, em cultivos que ofertam flores para abelhas, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) declarou temporariamente a restrição do uso desses mesmos inseticidas e deu início a um processo de reavaliação dessas substâncias. No entanto, atualmente encontramos essas substâncias sendo vendidas em suas formulações comerciais, com suas respectivas indicações de uso (AGROFIT, 2014).

Nos Estados Unidos, são registrados oito ingredientes ativos neonicotinóides, dos quais, imidacloprido é o mais utilizado. A United States Environmental Protection Agency (USEPA) (2012) elaborou um planejamento quanto ao uso dessas substâncias ativas, alertando sobre a questão das abelhas e outros polinizadores nas embalagens dos produtos comerciais, mas não baniu ou suspendeu a utilização desses ingredientes (Fairbrother et al., 2014).

Na Europa, em 2012, uma sequência de protestos com o propósito de banir o uso de inseticidas neonicotinóides em proteção às abelhas desencadeou uma série de questionamentos e investigações sobre o assunto. Em 2013, a European Food Safety Authority (EFSA) publicou um documento contendo uma compilação de estudos que apontaram valores residuais de neonicotinóides encontrados em materiais armazenados nas colônias de abelhas, bem como no pólen e néctar de culturas que ofertam flores atrativas a elas. Inferências foram realizadas quanto aos potenciais riscos que os resíduos poderiam oferecer para

abelhas. Com base nos resultados evidenciados, concluiu-se que muitas lacunas sobre os riscos que os neonicotinóides oferecem para abelhas e outros polinizadores ainda devem ser preenchidas. Assim, a posição definitiva da União Européia foi banir o uso de inseticidas neonicotinóides por dois anos (2013-2015), até que resultados mais consistentes sejam apresentados (EFSA, 2013).

10. CONSIDERAÇÕES REFERENTES À PROPOSTA DA TESE

A substância ativa imidacloprido tem sido o principal foco de estudo, no que se refere aos neonicotinóides e abelhas. No entanto, outros compostos, a exemplo de tiametoxam e seu metabólito clotianidina, tem sido alvo de especulações e carecem de informações quando aos seus efeitos (EFSA, 2013). Tiametoxam é o primeiro inseticida da segunda geração de neonicotinóides disponível comercialmente (precedido por imidacloprido) (Maienfisch et al., 2001) e sua utilização vem sendo amplamente evidenciada. Dessa forma, escolhemos para o nosso trabalho essa substância ativa, a fim de ser avaliada através da administração no alimento a ser ofertado às abelhas.

Cada espécie de abelha possui sua ecologia e, conseqüentemente, em cada uma, determinada substância ativa poderá interferir de maneiras diferentes. Os efeitos que os inseticidas causam em abelhas em diferentes idades é uma etapa essencial para a avaliação das conseqüências para a colônia como um todo. Os efeitos dos inseticidas em abelhas é um tema ainda em aberto e necessita amplamente de estudos. Uma interpretação cautelosa de nossos resultados servirá como importantes subsídios para a proposição de medidas mitigadoras quanto ao uso de inseticidas.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). *Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários*. Recuperado em 2 maio, 2014, do AGROFIT Web site: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- Alaux, C., Brunet, J. L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M., ... & Le Conte, Y. (2010). Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental microbiology*, 12(3), 774-782.
- Arena, M., & Sgolastra, F. (2014). A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*, 1-11.
- Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973-992.
- Brittain, C., & Potts, S. G. (2011). The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology*, 12(4), 321-331.
- Brosi, B. J., & Briggs, H. M. (2013). Single pollinator species losses reduce floral fidelity and plant reproductive function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32), 13044-13048.

Brown, M. J., & Paxton, R. J. (2009). The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, 40(3), 410-416.

Carreck, N. L., & Ratnieks, F. L. W. (no prelo). The dose makes the poison”: have “field realistic” rates of exposure of neonicotinoid insecticides to bees been overestimated in laboratory studies? *Ecology Letters*.

Cresswell, J. E. (2011). A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1), 149-157.

De la Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I., & Serrano, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40(3), 263-284.

Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 81-106.

Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., ... & Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18466-18471.

European Food Safety Authority (EFSA) (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid. *EFSA Journal*, 11, 3066–3068.

Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., & Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4), 719-731.

Fausser-Misslin, A., Sadd, B. M., Neumann, P., & Sandrock, C. (2013). Influence of combined pesticide and parasite exposure on bumblebee colony traits in the laboratory. *Journal of Applied Ecology*.

Feltham, H., Park, K., & Goulson, D. (2014). Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology*, 1-7.

Freitas, B. M., & Pinheiro, J. N. (2012). *Polinizadores e pesticidas: princípios de manejo para os agroecossistemas brasileiros*. Brasília: MMA.

Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105-108.

Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Bernardo, A. D., ... & Tapparo, A. (2009). Translocation of neonicotinoid insecticides from coated

seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *Journal of economic entomology*, 102(5), 1808-1815.

Godfray, H. C. J., Blacquire, T., Field, L. M., Hails, R. S., Petrokofsky, G., Potts, S. G., ... & McLean, A. R. (2014). A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1786), 20140558.

Goulson, D. (2013). Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.

Hardstone, M. C., & Scott, J. G. (2010). Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects?. *Pest management science*, 66(11), 1171-1180.

Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., ... & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.

Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J. T., & Roe, R. M. (2004). Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection*, 23(5), 371-378.

Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing

landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313.

Köhler, H. R., & Triebskorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. *science*, 341(6147), 759-765.

Kremen, C., Williams, N. M., & Thorp, R. W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16812-16816.

Kremen, C., Williams, N. M., Aizen, M. A., Gemmill-Herren, B., LeBuhn, G., Minckley, R., ... & Ricketts, T. H. (2007). Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: A conceptual framework for the effects of land-use change. *Ecology Letters*, 10(4), 299-314.

Laycock, I., Lenthall, K. M., Barratt, A. T., & Cresswell, J. E. (2012). Effects of imidacloprid, a neonicotinoid pesticide, on reproduction in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Ecotoxicology*, 21(7), 1937-1945.

Maienfisch, P., Huerlimann, H., Rindlisbacher, A., Gsell, L., Dettwiler, H., Haettenschwiler, J., ... & Walti, M. (2001). The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest management science*, 57(2), 165-176.

Meffe, G. K. (1998). The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology*, 12(1), 8-17.

Pettis, J. S., Johnson, J., & Dively, G. (2012). Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften*, 99(2), 153-158.

Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., & Rose, R. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS one*, 8(7), e70182.

Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide Residues and Bees—A Risk Assessment. *PloS one*, 9(4), e94482.

Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(11), 2482-2486.

Suryanarayanan, S., & Kleinman, D. L. (2013). Be (e) coming experts: The controversy over insecticides in the honey bee colony collapse disorder. *Social Studies of Science*, 43(2), 215-240.

Thompson, H. M. (2010). Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and ‘new issues’. *Pest Management Science*, 66(11), 1157-1162.

USEPA, United States Environmental Protection Agency. (2006). *What is a pesticide?*. Recuperado em 3 maio, 2014, do EPA Web site:

<http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>

USEPA, United States Environmental Protection Agency. (2012). *White Paper in Support of the Proposed Risk Assessment Process for Bees*. Recuperado em 6 maio, 2014, do EPA Web site:

http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/highlights.htm

Valdovinos-Núñez, G. R., Quezada-Euán, J. J. G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H., Carmona, A., & Sánchez, E. R. (2009). Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of economic entomology*, 102(5), 1737-1742.

Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351-352.

Wu, J. Y., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, 6(2), e14720.

CAPÍTULO 2

RESÍDUOS DO NEONICOTINÓIDE TIAMETOXAM CAUSAM DANOS EM ABELHAS EUSSOCIAIS?

**ANNELISE DE SOUZA ROSA, JAMES CRESSWELL, MARIA
JULIANA FERREIRA-CALIMAN, CARMEN SÍLVIA SOARES PIRES
E VERA LUCIA IMPERATRIZ-FONSECA**

RESÍDUOS DO NEONICOTINÓIDE TIAMETOXAM CAUSAM DANOS EM ABELHAS EUSSOCIAIS?

INTRODUÇÃO

A ação sistêmica dos neonicotinóides faz com que os ingredientes ativos atinjam o pólen e o néctar através de sua translocação pela planta. Assim, a principal rota de exposição de abelhas ocorre através da dieta, pela ingestão desses recursos que são levados para dentro das colônias pelas operárias forrageiras (Fairbrother et al., 2014).

Apis mellifera e *Bombus* spp. são espécies reconhecidas como polinizadoras essenciais para muitos cultivos agrícolas em diversas regiões do mundo. Por esse motivo, diversos trabalhos vêm sendo conduzidos acerca dos riscos da exposição desses polinizadores a cultivos tratados com inseticidas, especialmente os neonicotinóides. No que se refere à importância dos polinizadores, outro importante grupo de abelhas eussociais, as abelhas sem ferrão, vem sendo gradativamente valorizado como alternativa para a polinização comercial, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Slaa et al 2006).

Em estudo conduzido em laboratório, Laycok et al. (2012) constataram que o consumo de imidacloprido a 1ppb (μgkg^{-1}) através da administração em xarope reduz em pelo menos 1/3 a taxa de fecundidade de operárias de *Bombus terrestris*. Whitehorn et al. (2012), expondo colônias da mesma espécie a duas concentrações de imidacloprido (pólen: 6 e 12ppb; néctar: 0.7 e 1.4ppb) através da administração no alimento, reportaram prejuízos ao fitness das colônias através da redução no acúmulo de material biológico (cera, produção de crias, estoque de alimento e abelhas adultas). Na espécie *Apis mellifera*, Cresswell (2011)

demonstrou em estudo de meta-análise que a ingestão de concentrações entre 1 a 10ppb de imidacloprido por operárias não implicará em efeitos letais. Entretanto, o autor alerta para uma redução entre seis a 20% em aspectos como o crescimento das colônias, fecundidade e longevidade. Além disso, Sandrok et al. (2014) expondo colônias de *A. mellifera* a pólen contaminado com tiametoxam e clotianidina durante 46 dias, constatou redução no crescimento da colônia em longo prazo (um ano), atribuindo às elevadas taxas de substituição de rainhas e à reduzida tendência à enxameação. Em abelhas sem ferrão, o único estudo que abordou o grupo neonicotinóide via ingestão de imidacloprido indicou redução nos corpos pedunculados no cérebro e em parâmetros comportamentais de caminhada (distância e velocidade) (Tomé et al., 2012).

Existem muitos fatores a serem considerados quanto à susceptibilidade das espécies de abelhas aos inseticidas, tais como idade e tamanho dos indivíduos (Valdovinos-Nuñez et al., 2009). Embora qualquer estágio de desenvolvimento deva ser levado em consideração quanto ao risco de exposição (Wu et al., 2011), foi a partir das forrageiras que o problema atualmente conhecido como “Colony Collapse Disorder” foi observado: elas não retornam às colônias após forragear e nem são encontradas próximas aos ninhos (Evans et al., 2009).

Levando-se em consideração a importância global de abelhas como polinizadoras para a produção de alimentos (Klein et al., 2007) e o atual uso intensivo de neonicotinóides, esse trabalho selecionou como modelo para estudo uma espécie de cada tribo de abelhas eussociais: *Bombus terrestris audax* (Bombini), *Apis mellifera carnica* (Apini) e *Scaptotrigona bipunctata* (Meliponini). Para testar a hipótese de que o consumo de dieta à base de tiametoxam afeta negativamente os indivíduos dessas três espécies, o presente

estudo investigou se a taxa de consumo de alimento e a sobrevivência de operárias forrageiras decrescem de acordo com o aumento da dosagem do inseticida.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução dos experimentos foram utilizadas operárias forrageiras das três espécies. Os testes com *A. mellifera carnica* e *B. terrestris audax* foram conduzidos em laboratório na University of Exeter, Exeter, Devon, UK, entre o período de 20/08 a 07/10/2012. Os testes com *S. bipunctata* foram realizados em laboratório na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brasil, entre o período de 29/11 a 20/12/2012. As três espécies foram alimentadas com xarope (50% sacarose invertida; Attracker, Koppert B.V., Berkel en Rodenrijs, NL) contendo o inseticida tiametoxam em distintas dosagens. O ingrediente ativo tiametoxam (Pestanal®, analytical standard – Fluka) foi obtido da Sigma Aldrich, UK).

A espécie *B. terrestris audax* foi obtida de colônia domesticada de fornecedor comercial (Agralan, Model: Audax Bees, Manufacturer: Biobest). Os indivíduos de *A. mellifera carnica* e *S. bipunctata* foram capturados imediatamente na entrada dos ninhos, mantidos em apiário (University of Exeter, UK) e meliponário (PUCRS, Brasil), respectivamente. Caixas de madeira foram utilizadas para acomodar as abelhas e as partes laterais foram cobertas com tecido de malha fina para circulação de ar e monitoramento diário das mesmas.

Em todas as espécies as abelhas foram alimentadas com xarope puro durante 48 horas, a fim de minimizar os efeitos causados pelo estresse do confinamento nos indivíduos. Após esse período, as abelhas foram privadas de alimentação por 2 horas, e em seguida foram expostas ao xarope contaminado

com tiametoxam, dando início aos experimentos. Os indivíduos de *B. terrestris audax* (n=60) foram acomodados individualmente em caixas (dimensões: 0.06 x 0.05 x 0.035 m) e os de *A. mellifera carnica* (n=180) e *S. bipunctata* (n=180) foram agrupados em conjuntos de 10 indivíduos por caixa (dimensões: 0.01 x 0.08 x 0.018 m), onde em cada continha indivíduos oriundos de um mesmo ninho.

Em cada caixa foi colocado um eppendorf contendo xarope puro (grupo controle) ou xarope contendo uma das cinco doses de tiametoxam, em unidades de μgkg^{-1} , que seguem: 98.43; 39.37; 6.30; 0.16; 0.06. As abelhas alimentaram-se *ad libitum* nos eppendorfs. Em *A. mellifera carnica* e *S. bipunctata* foram realizadas três repetições/tratamento (n= 30 indivíduos/dose) (Medrzycki et al., 2013) e em *B. terrestris audax* 10 repetições/tratamento (n= 10 indivíduos/dose).

A escolha das doses foi baseada na compilação de estudos que apresentaram a variação de doses de tiametoxam registradas no néctar de culturas que ofertam flores atrativas para abelhas, a exemplo de canola e girassol (European Food Safety Authority (EFSA), 2012). Abrangeram-se as concentrações mínimas e máximas registradas, a partir da aplicação de tiametoxam via tratamento de sementes. Consideramos a dose de $98.43\mu\text{gkg}^{-1}$ como superdosagem (ou controle positivo).

Em cada espécie, o consumo de alimento foi registrado através da pesagem dos eppendorfs em balança analítica, do 1º ao 4º dia de exposição ao inseticida. A sobrevivência foi registrada diariamente, a partir do instante em que as abelhas foram expostas ao alimento contaminado. Os mesmos indivíduos foram utilizados para a avaliação de ambos os parâmetros.

As abelhas foram mantidas em condições controladas, com temperatura e umidade relativa média de 25°C e 40%, respectivamente.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste Kolgomorov-Smirnov-Liliefors foi utilizado para checagem da normalidade dos dados. Em seguida, os dados foram submetidos ao teste de correlação de Spearman (significância ao nível de 0.05) para verificação da relação parâmetro-dosagem em cada espécie.

No consumo de alimento, as médias obtidas dos tratamentos foram comparadas através do teste Kruskal Wallis (com significância ao nível de 0.05), seguido de comparações múltiplas (significativo ao nível de 0.05). Uma vez que os indivíduos de *S. bipunctata* não apresentaram diferença estatística, somente o teste de Kruskal Wallis foi aplicado. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa STATISTICA 8.0.

Os resultados de mortalidade foram submetidos à análise de sobrevivência, através do procedimento não paramétrico Kaplan-Meier, e as médias foram comparadas pelo teste Logrank (significativo ao nível de 0.05) seguido do método Sidak para comparações múltiplas *post hoc*. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa SPSS 17.0.

RESULTADOS

CONSUMO DE ALIMENTO

O consumo diário de alimento em *B. terrestris audax* (tabela 1) decresceu significativamente com o aumento das dosagens (correlação de Spearman, $\rho = -0.46$, $p < 0.05$). O grupo tratado à dose de $39.37 \mu\text{gkg}^{-1}$ apresentou a menor média de consumo e o teste Kruskal Wallis ($H = 9.80$, $p < 0.05$) seguido de comparações múltiplas indicou diferença estatística deste apenas em relação ao grupo controle ($p < 0.05$). O consumo em abelhas expostas à superosagem

(98.43 μgkg^{-1}) não foi registrado, uma vez que as operárias submetidas a esse tratamento não sobreviveram ao período experimental.

Em *A. mellifera carnica*, o teste de correlação de Spearman não indicou significância entre o consumo de alimento e dosagens ($\rho = 0.26$, $p > 0.05$). O grupo exposto à superdosagem apresentou a maior média de consumo (tabela 1), e o teste Kruskal Wallis ($H = 13.53$, $p < 0.05$) seguido de comparações múltiplas indicou diferença estatística deste apenas em relação aos indivíduos expostos a 0.16 μgkg^{-1} ($p < 0.05$).

Segundo o teste de correlação de Spearman, as operárias de *S. bipunctata* mostraram tendência ao decréscimo no consumo de alimento de acordo com o aumento das doses, mas essa correlação não foi significativa ($r = -0.43$, $p > 0.05$). O teste de Kruskal Wallis ($H = 5.27$, $p > 0.05$) indicou não haver diferença entre as dosagens, embora o grupo exposto a 39.37 μgkg^{-1} tenha evidenciado a menor média de consumo (tabela 1). Assim como evidenciado em *B. terrestris audax*, o consumo em abelhas expostas a 98.43 μgkg^{-1} não foi constatado, uma vez que operárias submetidas a esse tratamento não sobreviveram ao período experimental.

Tabela 1. Valores das médias seguidas de erro padrão quanto ao consumo diário de alimento por indivíduo (em miligramas) em cada dosagem, em *Bombus terrestris audax*, *Apis mellifera carnica* e *Scaptotrigona bipunctata*. Letras distintas indicam diferença estatística entre as médias obtidas pelo teste Kruskal Wallis seguido de comparações múltiplas (P é significativo ao nível de 0.05).

Dose (μgkg^{-1})	<i>Bombus terrestris audax</i>	<i>Apis mellifera carnica</i>	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>
0	164.65a $\pm$ 14.42	50.80a $\pm$ 1.95	17.72a $\pm$ 2.66
0.06	144.53ab $\pm$ 16.60	43.65a $\pm$ 0.88	15.29a $\pm$ 0.61
0.16	148.05ab $\pm$ 18.96	40.60ab $\pm$ 0.43	17.41a $\pm$ 2.63
6.30	126.70ab $\pm$ 18.67	46.46a $\pm$ 2.94	7.16a $\pm$ 2.60
39.37	109.62b $\pm$ 6.54	45.91a $\pm$ 1.02	11.81a $\pm$ 1.07
98.43	-----	54.53ac $\pm$ 2.25	-----

SOBREVIVÊNCIA

O tempo médio de sobrevivência dos indivíduos de *B. terrestris audax* apresentou relação dose – resposta significativa (correlação de Spearman, $\rho = -0.70$, $p < 0.05$), indicando decréscimo no tempo de vida com o aumento das dosagens. O teste Logrank ($\chi^2 = 51.83$, $p < 0.0001$) seguido do método Sidak indicou o grupo exposto à superdosagem distinto de todos os outros, apresentando o menor tempo de vida (tabela 2).

As operárias de *A. mellifera* apresentaram decréscimo significativo na sobrevivência com o aumento das dosagens (correlação de Spearman, $\rho = -0.36$, $p < 0.05$). O teste Logrank ($\chi^2 = 37.09$, $p < 0.0001$) seguido do método Sidak mostrou que abelhas expostas a $98.43 \mu\text{gkg}^{-1}$ diferiram dos grupos expostos até $0.16 \mu\text{gkg}^{-1}$. Embora os indivíduos expostos à superdosagem tenham evidenciado o menor tempo de vida (tabela 2), este grupo foi semelhante estatisticamente aos grupos tratados a partir de $6.30 \mu\text{gkg}^{-1}$.

Em *S. bipunctata* também houve decréscimo significativo no tempo de vida dos indivíduos (correlação de Spearman, $\rho = -0.30$, $p < 0.05$). O teste Logrank ($\chi^2 = 53.27$, $p < 0.0001$) seguido do método Sidak apontou a dose $98.43 \mu\text{gkg}^{-1}$ distinta das demais, indicando o menor tempo de vida para os indivíduos deste grupo (tabela 2).

Tabela 2. Valores das médias seguidas de erro padrão quanto ao tempo de sobrevivência por indivíduo (em dias) em cada dosagem, em *Bombus terrestris audax*, *Apis mellifera carnica* e *Scaptotrigona bipunctata*. Letras distintas indicam diferença estatística entre as médias obtidas pelo teste Logrank seguido do método Sidak para comparações múltiplas *post hoc* (P é significativo ao nível de 0.05).

Dose (μgkg^{-1})	<i>Bombus terrestris audax</i>	<i>Apis mellifera carnica</i>	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>
0	19.30a $\pm$ 0.57	7.73a $\pm$ 1.1	5.27a $\pm$ 0.90
0.06	16.00a $\pm$ 1.95	8.80a $\pm$ 1.03	6.33a $\pm$ 0.95
0.16	14.66a $\pm$ 1.88	8.20a $\pm$ 0.67	6.71a $\pm$ 0.74
6.30	12.62b $\pm$ 2.54	6.80ab $\pm$ 0.61	6.41a $\pm$ 1.17
39.37	12.40b $\pm$ 0.4	5.43ab $\pm$ 1.09	5.52a $\pm$ 0.90
98.43	5.10c $\pm$ 0.58	3.80b $\pm$ 0.48	0.50b $\pm$ 0.16

DISCUSSÃO

RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA EM *Bombus terrestris audax*

A relação dose – resposta em *B. terrestris audax* corrobora os resultados obtidos por Laycok et al. (2014), onde constataram redução significativa no consumo de alimento em suas maiores dosagens para a espécie *B. terrestris audax* (39.37 e 98.43 μgkg^{-1}). O estudo realizado por Elston et al. (2013), mostrou uma redução no consumo de xarope na dosagem de 10 μgkg^{-1} , ou seja, em concentração menor do que aquelas verificadas por Laycok e por nosso estudo. Laycok et al. (2014) inferem que a redução na taxa de alimentação a essa dosagem mais baixa, como encontrado por Elston et al. (2013), pode estar relacionada à oferta de pólen oferecido as abelhas que também estava contaminado, assim como o néctar.

Apesar de nossa configuração experimental ter diferido daquelas estabelecidas por Elston et al. (2013) e Laycok et al. (2014), onde avaliaram abelhas em mini colônias, nossos resultados sob avaliação individual mostraram a mesma tendência à redução do consumo de alimento em doses altas de tiametoxam. Nossos testes demonstraram que abelhas alimentadas a 39.37 μgkg^{-1} consumiram menos do que os outros grupos. Quanto à sobrevivência, observamos que a partir de 6.30 μgkg^{-1} as operárias apresentaram redução significativa no tempo de vida, sendo este acentuado em indivíduos do grupo exposto a 98.43 μgkg^{-1} .

Assim, podemos estabelecer que, em exposição oral crônica, indivíduos de *B. terrestris audax* começam a ter o seu desempenho alimentar e sobrevivência afetada em dosagens iguais ou superiores a 39.37 e 6.30 μgkg^{-1} , respectivamente.

RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA EM *Apis mellifera carnica*

Em *A. mellifera carnica*, a relação dose-resposta não foi significativa. O que podemos observar é que houve um estímulo no consumo de alimento em indivíduos expostos à superdosagem, o que ocasionou redução significativa no tempo de vida nas abelhas desse grupo. Nossos resultados obtidos até $39.37\mu\text{gkg}^{-1}$ são próximos aos obtidos por Cresswell et al. (2012) que em laboratório, sob exposição crônica ao neonicotinóide imidacloprido, constataram que um indivíduo de *A. mellifera* consome em média 50mg diário de xarope, contendo 4.9ng do ingrediente ativo, sem exibir qualquer resposta em relação ao grupo controle, tanto no que se refere ao consumo de alimento quanto à sobrevivência. Os autores inferem que se o alimento tivesse sido ofertado de uma única vez, na mesma concentração, porém numa quantidade a ser consumida imediatamente por uma abelha, esse indivíduo acumularia sua dose letal de 4.5ng de imidacloprido (Cresswell, 2011) e conseqüentemente não sobreviveria.

A hipótese de Cresswell et al. (2012) pode ser reforçada com os resultados obtidos por Suchail et al. (2001), que constataram discrepância entre avaliação de toxicidade de exposição aguda e crônica: abelhas alimentadas de uma única vez (exposição aguda), apresentaram sintomas neurotóxicos imediatos e sua dose letal foi observada entre 48 e 96h de experimento. Em contrapartida, abelhas alimentadas com exposição crônica, atingiram sua dose letal somente no 8º dia.

Em nossos experimentos com tiametoxam, os indivíduos de *A. mellifera* apresentaram um estímulo no consumo de alimento em abelhas expostas a $98.43\mu\text{gkg}^{-1}$. Quanto à sobrevivência, indivíduos expostos até $39.37\mu\text{gkg}^{-1}$ não apresentaram alterações em relação aos outros grupos. Assim, pelo menos até uma dosagem de $39.37\mu\text{gkg}^{-1}$, podemos relacionar nossos resultados com a hipótese de

Cresswell et al. (2012), de que as abelhas ingeriram o ingrediente ativo gradualmente ao longo do dia e metabolizaram continuamente, evitando seu acúmulo em nível letal. Em acréscimo, Suchail et al. (2004) observaram que o imidacloprido é rapidamente metabolizado por indivíduos da espécie *A. mellifera* e possui uma meia vida de 4.5 a 5h, no corpo de uma abelha. Brunet et al. (2005), quantificando resíduos do neonicotinóide acetamiprida em *A. mellifera*, constataram também o rápido metabolismo dessa substância por essas abelhas.

Embora nosso estudo não tenha investigado o metabolismo de tiametoxam em abelhas, com base no rápido metabolismo registrado para outros grupos de neonicotinóides (Suchail et al., 2004, Brunet et al., 2005), inferimos a possibilidade dessa substância ativa também ser rapidamente metabolizada por abelhas da espécie *A. mellifera*, em função do consumo gradual do alimento.

RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA EM *Scaptotrigona bipunctata*

São escassos os trabalhos que enfatizam o uso de inseticidas em abelhas sem ferrão (Valdovinos-Núñez et al., 2009; Xavier et al., 2010; Lourenço et al., 2012; Sanchèz et al., 2012; Ferreira et al., 2013; Jacob et al., 2013) e apenas o trabalho desenvolvido por Tomé et al. (2012) aborda o uso de neonicotinóides nesse grupo de abelhas, utilizando como modelo a espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Os autores constataram que abelhas expostas ao neonicotinóide imidacloprido durante o estágio larval, a partir do quarto dia de emergência, apresentam redução significativa no volume dos corpos pedunculados cerebrais e em parâmetros tais como distância e velocidade percorridas, com o aumento das dosagens de imidacloprido.

Diferentemente do estudo de Tomé et al. (2012), nosso trabalho abrangeu experimentos com exposição de abelhas durante a fase adulta. Entretanto, as informações disponíveis na literatura, referentes a inseticidas e abelhas sem ferrão nessa idade, se referem a testes de toxicidade aguda (Valdovinos-Núñez et al., 2009; Xavier et al., 2010) e abrangem outros grupos químicos de inseticidas (Valdovinos-Núñez et al., 2009; Xavier et al., 2010; Sanchèz et al., 2012; Ferreira et al., 2013). Por exemplo, experimentos com fipronil (classe química pirazol) mostraram que a espécie *Melipona scutellaris* ($CL_{50}=0.011$ ng i.a.l⁻¹ solução de sacarose) (Lourenço et al., 2012) é mais sensível ao ingrediente ativo do que *Scaptotrigona postica* ($CL_{50}=0.24$ ng l⁻¹) (Jacob et al., 2013). Dessa maneira, seria equivocado compararmos os nossos resultados aos de toxicidade aguda, uma vez que a duração da exposição difere e, além disso, nossos testes são voltados para o grupo químico dos neonicotinóides.

Em nosso estudo, embora os indivíduos de *S. bipunctata* não tenham respondido às dosagens e a estatística não tenha considerado o grupo submetido a $39.37\mu\text{gkg}^{-1}$ distinto dos demais quanto ao consumo de alimento, constatamos nessa dosagem a menor média de consumo. Assim, consideramos que resíduos em doses iguais ou superiores a essa devem ser considerados como alerta, uma vez que abelhas expostas a $98,43\mu\text{gkg}^{-1}$ sobreviveram, no máximo, 12 horas.

EXPANSÃO DOS RESULTADOS PARA UMA CONFIGURAÇÃO AMBIENTAL

Os experimentos conduzidos neste estudo representaram um cenário adverso para abelhas, sem qualquer alternativa de escolha para forrageio. Muitos fatores devem ser levados em consideração para uma avaliação de risco de

determinado inseticida, tais como a atratividade da cultura aos polinizadores, a rota de exposição, os efeitos sinérgicos, etc. (EFSA, 2013).

Pilling et al., (2013) avaliaram a longo prazo os efeitos de tiametoxam em colônias de *A. mellifera* em situação real de campo, procurando abranger todas essas variáveis. O estudo de quatro anos concluiu que os resíduos presentes no néctar e no pólen, oriundos de tratamento de sementes, apresentam baixo risco para essa espécie de abelha. Os autores criticam severamente a expansão dos resultados obtidos em estudos de laboratório para uma configuração real, alegando que, além disso, os efeitos subletais constatados nessas condições são provenientes de abelhas expostas a doses muito mais altas do que aquelas encontradas em campo (Gill et al., 2012; Henry et al., 2012; Schneider et al., 2012; Whitehorn et al., 2012). O estudo de Pilling et al. (2013) monitorou apenas colônias de *A. mellifera*, assim, a generalização desses resultados para uma avaliação de risco deve ser considerada cautelosamente, uma vez que diferentes espécies de abelhas possuem suas particularidades quanto a sua biologia e ecologia (EFSA, 2013).

Nesse contexto, é extremamente importante alertar para o fato de que em nossos testes, além das dosagens reais, abrangemos também uma dose extrapolada ($98.43\mu\text{gkg}^{-1}$) do que aquelas encontradas como traços residuais em campo, oriundas de tratamento de sementes. De acordo com os dados apresentados pela EFSA (2013), especificamente sobre tiametoxam, em culturas atrativas para abelhas, as doses registradas em campo vindas desse tipo de tratamento para girassol é de $36\mu\text{gkg}^{-1}$ e para canola entre 32 e $81\mu\text{gkg}^{-1}$. Em nosso estudo, as doses reais estão representadas entre o intervalo de 0.06 a $39.37\mu\text{gkg}^{-1}$.

De acordo com os nossos resultados, os indivíduos de *B. terrestris audax* apresentaram alterações em ambos os parâmetros avaliados em doses iguais ou superiores a $39.37\mu\text{gkg}^{-1}$. Esse valor está representado no intervalo de doses reais encontradas em campo para canola, plantação cultivada em grande escala em países da Europa e Estados Unidos, onde é ampla a ocorrência dessa espécie de abelha (Goulson, 2010). Sendo considerada uma importante polinizadora de flores desse cultivo, torna-se importante a consideração dos potenciais prejuízos causados por essas dosagens aplicadas em sementes, no que se refere às populações de abelhas dessa espécie.

Os indivíduos de *A. mellifera* apresentaram alterações no consumo de alimento e sobrevivência a $98.43\mu\text{gkg}^{-1}$. As abelhas expostas a essa dosagem consumiram maior quantidade de alimento, mas esse estímulo alimentar ocasionou redução significativa no seu tempo de vida. Se levarmos em consideração as dosagens reais de campo apresentadas pela EFSA (2013), a concentração de $98.43\mu\text{gkg}^{-1}$, que mostrou alteração nos indivíduos, não está representada nesse intervalo. A ampla distribuição geográfica dessa espécie o seu reconhecido potencial polinizador para cultivos agrícolas que alimentam o mundo (Klein et al., 2007) a torna o principal foco para a condução de estudos de avaliação de risco de pesticidas.

Quanto à espécie *S. bipunctata*, de ocorrência Neotropical (Moure et al., 2013), os indivíduos começaram a sinalizar decréscimo em seu desempenho alimentar a uma dose de $39.37\mu\text{gkg}^{-1}$, contida no intervalo apresentado pela EFSA (2013). A sobrevivência dos indivíduos foi afetada a $98.43\mu\text{gkg}^{-1}$, que também está acima das doses reais indicadas. O hábito generalista de forrageamento em abelhas sem ferrão (Michener, 2007) e a ampla ocorrência do gênero

Scaptotrigona em regiões com culturas atrativas que fazem o uso de tiametoxam e outros neonicotinóides, tais como girassol e algodão no Brasil (AGROFIT, 2014), a tornam um importante grupo a ser considerado como modelo para estudos de riscos de pesticidas para espécies nativas brasileiras.

Nosso estudo abrangeu a simulação de dosagens registradas no néctar, a partir de sementes tratadas com tiametoxam. No entanto, é importante considerar que o tratamento de sementes não é o único meio aplicação de neonicotinóides. A pulverização foliar e a aplicação no solo apresentam doses significativamente maiores no pólen e néctar, comparando-se à aplicação abordada em nosso estudo (EFSA, 2013; Goulson, 2013).

Nosso estudo avaliou os possíveis efeitos decorrentes da ingestão do inseticida tiametoxam em abelhas forrageiras, em nível individual e em condições de laboratório. A expansão dos nossos resultados para uma situação real em campo em nível de colônia deve ser considerada cuidadosamente, uma vez que experimentos realizados em laboratório geram um ambiente de estresse para as abelhas, comparativamente a testes realizados com colônias (Williams et al., 2013). A fim de minimizar as inúmeras variáveis que interferem os testes conduzidos em laboratório, nosso estudo procurou seguir os padrões metodológicos sumarizados na revisão realizada por Williams et al. (2013).

De acordo com nossos resultados, tiametoxam apresenta potencial para afetar o consumo de alimento e o tempo de vida em abelhas. As abelhas sinalizaram alterações quando expostas a $39.37\mu\text{gkg}^{-1}$ em ambos os parâmetros avaliados em *B. terrestris audax* e no consumo de alimento em *S. bipunctata*. As operárias de *Apis mellifera* apresentaram alterações quando expostas à nossa dose extrapolada.

A partir desses resultados, cautelosamente inferimos a possibilidade da espécie *B. terrestris audax* ser mais suscetível à ação de tiametoxam, seguida de *S. bipunctata* e *A. mellifera*. Assim, nosso trabalho contribuiu apresentando importantes subsídios para estudos mais complexos que envolvam os potenciais riscos do uso do neonicotinóide tiametoxam para o *fitness* da colônia e para populações de abelhas, a partir de três espécies de abelhas eussociais, reconhecidas mundialmente como importantes polinizadoras.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à University of Exeter, Hatherly Labs, pela concessão de espaço para a realização do estudo com *Bombus terrestris audax* e *Apis mellifera*; aos colegas François-Robert Xavier e Ian Laycok, desta Universidade, pelo apoio recebido para a condução dos experimentos; à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e à Dra. Betina Blochtein, desta Universidade, pela concessão de espaço para a realização dos testes com *Scaptotrigona bipunctata*. Ao Prof. Dr. Fábio Nascimento, pelo auxílio nas análises estatísticas; ao CNPq, pela bolsa de Doutorado, e a CAPES, pela bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

REFERÊNCIAS

AGROFIT, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). *Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários*. Recuperado em 2 maio, 2014, do AGROFIT Web site: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973-992.

Brittain, C., & Potts, S. G. (2011). The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology*, 12(4), 321-331.

Brunet, J. L., Badiou, A., & Belzunces, L. P. (2005). *In vivo* metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest management science*, 61(8), 742-748.

Cresswell, J. E. (2011). A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1), 149-157.

Cresswell, J. E., Page, C. J., Uygun, M. B., Holmbergh, M., Li, Y., Wheeler, J. G., ... & Tyler, C. R. (2012). Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology*, 115(6), 365-371.

Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 81-106.

Elston, C., Thompson, H. M., & Walters, K. F. (2013). Sub-lethal effects of thiamethoxam, a neonicotinoid pesticide, and propiconazole, a DMI fungicide, on

colony initiation in bumblebee (*Bombus terrestris*) micro-colonies. *Apidologie*, 44(5), 563-574.

European Food Safety Authority (EFSA) (2012). Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. *EFSA Journal*, 10, 2668.

European Food Safety Authority (EFSA) (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin, thiamethoxam, imidacloprid. *EFSA Journal*, 11, 3066–3068.

Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., Frazier, M., ... & Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: a descriptive study. *PloS one*, 4(8), e6481.

Ferreira, R. A. C., Silva Zacarin, E. C. M., Malaspina, O., Bueno, O. C., Tomotake, M. E. M., & Pereira, A. M. (2013). Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. *Micron*, 46, 57-65.

Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105-108.

Goulson, D. (2010). *Bumblebees: behavior, ecology and conservation*. Oxford: University Press.

Goulson, D. (2013). Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.

Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., ... & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.

Jacob, C. R. O., Soares, H. M., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C. F., & Malaspina, O. (2013). Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 90(1), 69-72.

Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2010). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2897-2908.

Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1608), 303-313.

Laycock, I., Cotterell, K. C., O'Shea-Wheller, T. A., & Cresswell, J. E. (2014). Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees. *Ecotoxicology and environmental safety*, 100, 153-158.

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

Maienfisch, P., Huerlimann, H., Rindlisbacher, A., Gsell, L., Dettwiler, H., Haettenschwiler, J., ... & Walti, M. (2001). The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest management science*, 57(2), 165-176.

Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L., Chauzat, M. P., Classen, C., ... & Vidau, C. (2013). Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*.

Michener, C. D. (2007) *The Bees of the World*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (2013). *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region*. Recuperado em 2 maio, 2014, do Web site: <http://moure.cria.org.br/>

Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., & Rose, R. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS one*, 8(7), e70182.

Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N., & Tornier, I. (2013). A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PloS one*, 8(10), e77193.

Sánchez, D., Solórzano, E. D. J., Liedo, P., & Vandame, R. (2012). Effect of the Natural Pesticide Spinosad (GF-120 Formulation) on the Foraging Behavior of *Plebeia moureana* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 105(4), 1234-1237.

Sandrock, C., Tanadini, M., Tanadini, L. G., Fauser-Misslin, A., Potts, S. G., & Neumann, P. (2014). Impact of Chronic Neonicotinoid Exposure on Honeybee Colony Performance and Queen Supersedure. *PloS one*, 9(8), e103592.

Schneider, C. W., Tautz, J., Grünewald, B., & Fuchs, S. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS one*, 7(1), e30023.

Slaa, E. J., Chaves, L. A. S., Malagodi-Braga, K. S., & Hofstede, F. E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37(2), 293-315.

Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(11), 2482-2486.

Suchail, S., Debrauwer, L., & Belzunces, L. P. (2004). Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. *Pest management science*, 60(3), 291-296.

Thompson, H. M. (2010). Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and ‘new issues’. *Pest Management Science*, 66(11), 1157-1162.

Tomé, H. V. V., Martins, G. F., Lima, M. A. P., Campos, L. A. O., & Guedes, R. N. C. (2012). Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PloS one*, 7(6), e38406.

Valdovinos-Núñez, G. R., Quezada-Euán, J. J. G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H., Carmona, A., & Sánchez, E. R. (2009). Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of economic entomology*, 102(5), 1737-1742.

Van der Sluijs, J. P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J. M., & Belzunces, L. P. (2013). Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current opinion in environmental sustainability*, 5(3), 293-305.

Xavier, V. M., Message, Dejair, Picanco, M. C., Bacci, L., Silva, G. A., & Benevenuto, J. D. S. (2010). Impact of Botanical Insecticides on Indigenous Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 56(3), 713-725.

Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351-352.

Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., ... & Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under *in vitro* laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1.

Wu, J. Y., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, 6(2), e14720.

CAPÍTULO 3

**O CONSUMO DO NEONICOTINÓIDE
TIAMETOXAM DURANTE A FASE LARVAL
INTERFERE NO DESENVOLVIMENTO DA
ESPÉCIE DE ABELHA SEM FERRÃO
*SCAPTOTRIGONA AFF. DEPILIS?***

**ANNELISE DE SOUZA ROSA, JULIANA STEPHANIE GALASCHI
TEIXEIRA, AYRTON VOLLET-NETO, CARMEN SÍLVIA SOARES
PIRES E VERA LÚCIA IMPERATRIZ-FONSECA**

O CONSUMO DO NEONICOTINÓIDE TIAMETOXAM DURANTE A FASE LARVAL INTERFERE NO DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE DE ABELHA SEM FERRÃO *SCAPTOTRIGONA AFF. DEPILIS*?

INTRODUÇÃO

A sensibilidade dos organismos a distúrbios ambientais durante o desenvolvimento pode ter como consequência uma tendência a mudanças morfológicas em resposta a essas perturbações, o que é conhecido como instabilidade no desenvolvimento. Essa instabilidade é expressa fenotipicamente através da variação dentro do indivíduo e pode ser mensurada através da assimetria flutuante em organismos bilaterais, parâmetro considerado indicador de alterações ambientais (Dongen, 2006). Considerando que o fenótipo é onde o resultado da perturbação será observado, a presença de alterações em relevantes marcadores morfológicos como distância intertegular e largura da cabeça (Bosch & Vicens, 2002; Lima et al., 2011; Lima et al., 2013) e/ou tamanho e forma das asas indicaria que o organismo está sob pressão de algum tipo de estressor ambiental (Costa, 2008).

Nesse contexto, a desordem do colapso da colônia (colony collapse disorder) tem sido uma das maiores preocupações em relação ao declínio de populações de abelhas no mundo (Brown & Paxton, 2009; Potts et al., 2010), e o uso de inseticidas neonicotinóides tem sido um dos maiores atributos a esse acontecimento (Goulson, 2013; Van der Sluijs et al., 2013). A aplicação dessa nova classe química de inseticidas em culturas agrícolas que ofertam flores atrativas às abelhas é mundialmente crescente (Jeschke et al., 2010; Köhler & Triebkorn, 2013), e a possibilidade de sua ação neurotóxica (Maienfisch et al.

2001) atingir organismos não alvo, a exemplo de abelhas, justifica a intensificação de estudos que buscam respostas a essas lacunas no conhecimento (Gill et al., 2012; Arena & Sgolastra, 2014; Costa et al., 2014; Fairbrother et al., 2014; Feltham et al., 2014).

Para Rortais et al., 2005, dentre as abelhas sociais, as forrageiras estão mais sujeitas à exposição a pesticidas do que abelhas mais jovens, que permanecem dentro do ninho. Contudo, assim que retornam do campo, as forrageiras levam à colônia os recursos florais, que posteriormente serão processados pelas operárias nutridoras (Nogueira-Neto, 1997; Hartfelder et al., 2006) e oferecidos às crias, compondo o alimento larval. Assim, se houver a presença de qualquer resíduo, haverá contato entre o alimento contaminado do campo e as larvas no interior do ninho (Villa et al., 2000). Dessa maneira, é importante avaliar os possíveis riscos provenientes da ingestão de resíduos nessa fase. Além disso, a possibilidade de malformações dos indivíduos deve também ser considerada, uma vez que isso pode causar implicações no desenvolvimento de suas atividades para a colônia (Wu et al., 2011).

A maioria dos trabalhos relacionados aos efeitos de pesticidas sobre abelhas tem considerado a fase adulta dos insetos, usando como modelo principalmente a espécie *Apis mellifera* (Cresswell, 2011; Hopwood et al., 2012; Costa et al., 2014; Fairbrother et al., 2014). Os estudos acerca da exposição de abelhas durante a fase larval, através de testes de criação *in vitro*, também enfatizam essa espécie (Peng et al., 1992; Aupinel et al., 2007a; Aupinel et al., 2007b; Hendriksma et al., 2012; Wilkins et al., 2013; Charpentier et al., 2014). No entanto, Kremen et al. (2002) destacam a importância de polinizadores nativos no contexto do uso de inseticidas na agricultura. Apesar da importância como

polinizadores nativos no Brasil, o primeiro e único estudo até o momento que abordou a exposição de abelhas sem ferrão durante a fase larval a inseticidas foi publicado por Tomé et al. (2012), utilizando *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Os autores encontraram uma série de efeitos adversos a essa espécie, a exemplo de redução nos corpos pedunculados no cérebro, ocasionados pela exposição ao neonicotinóide imidacloprido.

No Brasil, a espécie de abelha nativa *Scaptotrigona* aff. *depilis* visita uma ampla gama de recursos florais (Faria et al., 2012). Sua distribuição em diversas regiões do país (Moure et al., 2013), onde é permitida a aplicação de inseticidas neonicotinóides em cultivos que ofertam flores atrativas a abelhas (AGROFIT, 2014), a torna uma importante espécie a ser considerada para investigação quanto aos possíveis danos causados pelo uso desses inseticidas. Tiametoxam faz parte desse grupo químico e é o primeiro inseticida da segunda geração de neonicotinóides disponível comercialmente (precedido por imidacloprido) (Maienfisch et al., 2001).

Para nosso estudo, selecionamos a espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona* aff. *depilis* e o inseticida tiametoxam para averiguar os potenciais riscos que esse grupo químico oferece às abelhas nativas. Assim, a fim de testar nossa hipótese de que operárias de *Scaptotrigona* aff. *depilis* manifestam efeitos adversos em decorrência do consumo do neonicotinóide tiametoxam durante a fase larval, nós investigamos (a) se a taxa de mortalidade em cada fase de desenvolvimento aumenta de acordo com o aumento das dosagens; (b) se o consumo de tiametoxam causa desenvolvimento tardio dos imaturos e (c) se larvas originam indivíduos menores e assimétricos.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL E ESPÉCIE ESTUDADA

O estudo foi executado na Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto, e a espécie escolhida como modelo para esse estudo foi *Scaptotrigona* aff. *depilis* Moure 1942.

ESTIMATIVA DE CONSUMO DE PÓLEN POR LARVAS E ESTABELECIMENTO DAS DOSAGENS

Uma vez que é durante a fase larval que as abelhas sem ferrão mais consomem pólen (do Carmo Zerbo et al., 2001), a escolha das doses a serem administradas no presente estudo foi baseada nas dosagens de tiametoxam presentes no pólen proveniente de sementes tratadas com esse ingrediente ativo (European Food Safety Authority (EFSA), 2012). Para tanto, estimamos a quantidade de pólen consumida por larva através do alimento larval de três favos de cria oriundos de colônias diferentes. As células de cria foram desoperculadas, os ovos foram removidos, e de cada favo foi coletado o alimento de 100 células. O conteúdo de cada favo foi colocado separadamente em três tubos falcon (capacidade de 15ml), previamente pesados em balança analítica. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rpm, e em seguida, o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram novamente pesados apenas com a camada inferior, correspondente ao pólen, e assim obtivemos o peso médio de pólen consumido por larva (9.6mg, sd= 3.31).

A partir desses resultados, foi possível estimar a quantidade de tiametoxam a ser consumida por larva em condições naturais, levando-se em consideração os dados apresentados pela EFSA (2012). Esse documento reporta a compilação de

estudos realizados em cultivos que ofertam flores atrativas para abelhas, indicando que as dosagens registradas no pólen variam de 0.2 a 3.6 μ g do ingrediente ativo (i.a.) por kilograma de pólen. Com base nesses valores, estabelecemos a dose de 2 μ gkg⁻¹ para o embasamento de nosso estudo.

Assim, levando-se em consideração a dosagem de 2 μ gkg⁻¹ em condições naturais, e que uma larva consome em média 9,6mg de pólen, cada célula de cria deve conter 0.0192ng de tiametoxam/célula de cria. O fato de que as larvas de abelhas sem ferrão consomem todo o alimento contido na célula possibilitou o conhecimento da quantidade de tiametoxam ingerida por larva.

INSETICIDA E DIETA

O ingrediente ativo tiametoxam (Pestanal®, analytical standard – Fluka) foi obtido da Sigma Aldrich, UK. Água destilada foi usada para preparar a solução estoque e então, foi adicionado ao alimento larval, até atingir as seguintes dosagens (em ng i.a./larva): 0.0 (CS, controle com solvente adicionado), 0.007 (T1), 0.044 (T2) e 4.375 (T3). O grupo controle foi identificado como CN (controle negativo). Dessa maneira, abrangemos dois valores próximos e um extrapolado para nosso estudo, levando-se em consideração a estimativa de que uma célula de cria deve conter 0.0192ng de tiametoxam.

CRIAÇÃO *IN VITRO* DE ABELHAS SEM FERRÃO

A técnica adotada para os bioensaios *in vitro* foi baseada no método desenvolvido por Menezes et al. (2013) para criação de rainhas de abelhas sem ferrão. Nesse estudo, a técnica foi adaptada para o desenvolvimento de operárias. Para o nosso delineamento experimental, nós consideramos e adaptamos os

métodos padronizados para pesquisa de toxicidade em *Apis mellifera* (Medrzycki et al., 2013).

Para esse estudo, favos de cria de diferentes colônias de *Scaptotrigona aff. depilis* foram utilizados ao acaso. De cada colônia foram coletados um ou dois favos contendo larvas de aproximadamente 24 horas. Quatro repetições de 50 indivíduos foram avaliadas, para cada dose de tiametoxam. Cada repetição continha larvas de uma mesma colônia (Crailsheim et al., 2013). Nas placas de acrílico, cada célula recebeu 35µl de alimento larval e em seguida foram colocadas em incubadora com temperatura controlada, variando entre 28 e 29°C, durante 48 horas. Após esse período, larvas foram transferidas de favos naturais para placas de acrílico e devolvidas à incubadora. Para o controle de umidade nós utilizamos o tratamento com a maior taxa de sobrevivência (97.9%) desenvolvida por Menezes et al. (2013): 100% de umidade durante os primeiros 6 dias após a transferência larval e 75% durante os dias adicionais de desenvolvimento.

DESENVOLVIMENTO

Parâmetros biologicamente significativos quanto ao desenvolvimento foram avaliados (Wu et al., 2011): os indivíduos foram monitorados diariamente e a taxa de mortalidade foi registrada, desde a transferência larval até a emergência dos adultos; o tempo de desenvolvimento do estágio de larva jovem (recém transferida) até o último estágio de pupa foram registrados; e o tempo de desenvolvimento dos indivíduos em cada estágio foi reportado. Indivíduos mortos foram identificados pela ausência de movimento no espiráculo e removidos das placas (Tomé et al., 2012).

MORFOMETRIA

Após a emergência dos indivíduos adultos, a distância intertegular e a largura da cabeça foram medidas (Bosch & Vicens, 2002; Lima et al., 2011; Lima et al., 2013), a partir de imagens obtidas de microscópio estereoscópico (Leica MZ16) com câmera digital acoplada (Leica DFC500) e LAS 3.8.0 software.

Uma vez que as asas são um excelente sistema de estudo em assimetria flutuante, por serem essencialmente bidimensionais e suas veias proporcionarem marcos anatômicos definidos (Klingenberg & McIntyre, 1998), foram montadas lâminas das asas anteriores de operárias de *Scaptotrigona* aff. *depilis* pertencentes aos cinco tratamentos: CN (n=73); CS (n=82); T1 (n=168); T2 (n=77); T3 (n=77). As asas foram fotografadas com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio e a partir delas foi construído um arquivo .tps com o auxílio do software tpsUtil versão 1.40 (Rohlf, 2008a). A partir de então, foram identificados e estabelecidos 11 marcos anatômicos das junções das nervuras das asas (Figura 1) com o software tpsDig versão 2.12 (Rohlf, 2008b), com intuito de verificar a assimetria de asas, através de parâmetros como tamanho do centroide (raiz quadrada da soma das distâncias quadradas dos marcos anatômicos ao centroide, ou centro de massa) e forma das asas (Bookstein, 1996; Klingenberg & McIntyre, 1998).

Para a análise do tamanho do centroide utilizou-se o teste ANOVA padrão para assimetria flutuante (Palmer & Strobeck, 1986) e para a análise dos padrões de venação das asas utilizou-se o teste ANOVA de Procrustes correspondente (Klingenberg & McIntyre, 1998). Na análise de Procrustes as imagens das asas são redimensionadas para um tamanho uniforme, sobrepostas com base em seus centroides e rotacionadas para produzirem um alinhamento ideal, onde o

somatório das distâncias entre os marcos anatômicos homólogos seja a menor possível. Desse modo, as diferenças restantes são correspondentes à variação de forma. A ANOVA de Procrustes é um método para a quantificação das quantidades relativas de variação em diferentes níveis (Klingenberg et al., 2002) e tem sido usada principalmente em estudos de assimetria esquerda - direita para avaliar a quantidade de erros de medição em relação às fontes biológicas de variação. As análises de morfometria de asas foram verificadas no software MorphoJ versão 1.03 (Klingenberg, 2011).

Figura 1: Asa direita de operária de *Scaptotrigona* aff. *depilis* com os 11 marcos anatômicos nas junções das nervuras das asas.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste Kolgomorov-Smirnov-Liliefors foi utilizado para a checagem da normalidade dos dados. Para a comparação entre as médias entre os tratamentos nos parâmetros mortalidade, tempo de desenvolvimento, distância intertegular e largura da cabeça foi utilizado o teste ANOVA. Aos parâmetros que indicaram diferença estatística foi aplicado o teste de Fisher ou Tukey *post hoc* (ambos com significância ao nível de 0.05). As análises foram obtidas a partir do software Statistica 8.0. Para todas as análises morfométricas, machos emergidos foram excluídos.

RESULTADOS

DESENVOLVIMENTO

O teste ANOVA ($F= 48.68$, $p<0.00001$) seguido de Fisher *post hoc* (p significativo a 0.05) indicou que a mortalidade total até o último estágio de desenvolvimento pupal foi semelhante entre os tratamentos CN (13.2%), CS (13.6%), T1 (14%) e T2 (19.75%). Este último mostrou similaridade também ao grupo exposto a maior dosagem T3 (30.75%), o qual se distinguiu significativamente dos demais (T3 x CN: $p< 0.01$; T3 x CS: $p< 0.05$; T3 x T1: $p<0.05$) (figura 2).

Figura 2. Mortalidade total de indivíduos de *Scaptotrigona aff. depilis* até o último estágio pupal, em cada tratamento: CN (controle negativo), CS (controle com solvente: 0.0ng/larva), T1 (0.007ng/larva), T2 (0.044ng/larva) e T3 (4.375ng/larva). Letras distintas indicam diferença estatística obtida pelo teste ANOVA seguido de Fisher *post hoc* ($p < 0.05$). Barras representam os valores de desvio padrão da média. O “n” amostral em cada coluna corresponde ao número de dias em que ocorreram mortes em cada tratamento.

A maior ocorrência de mortes foi verificada durante a fase larval (do 1° ao 13° dia, aproximadamente), para todos os tratamentos (figura 3). Apenas nesta fase ocorreu distinção entre tratamentos (ANOVA, $F= 36.55$, $p<0.00001$; Fisher *post hoc* significativo ao nível de $p<0.05$): os tratamentos CN (12.12%), CS (13.84%), T1 (24%) e T2 (25.5%) foram semelhantes entre si. Este último mostrou similaridade também ao grupo exposto a maior dosagem T3 (39.89%), o qual diferiu significativamente dos demais: (T3 x CN: $p< 0.01$; T3 x CS: $p< 0.01$; T3 x T1: $p<0.05$). Nas fases de pré-pupa (ANOVA, $F= 3.20$, $p>0.5$) e pupa (ANOVA, $F= 1.42$, $p>0.5$) as taxas de mortalidade não diferiram entre os tratamentos.

Figura 3. Taxa de mortalidade de indivíduos de *Scaptotrigona* aff. *depilis* em cada fase de desenvolvimento (representadas pelas colunas), em cada tratamento: CN (controle negativo), CS (controle com solvente: 0.0ng/larva), T1 (0.007ng/larva), T2 (0.044ng/larva) e T3 (4.375ng/larva). Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste ANOVA seguido de Fisher *post hoc* ($p < 0.05$). Barras representam os valores de desvio padrão da média. A comparação entre as médias indicadas pelas letras é feita entre as colunas correspondentes ao mesmo estágio de desenvolvimento.

O teste ANOVA ($F= 529.59$, $p<0.0000$) indicou que o tempo de desenvolvimento das larvas jovens até o último estágio de pupa diferiu entre todos os tratamentos, exceto entre o grupo CN e CS (figura 4). Um atraso significativo no desenvolvimento é evidenciado nas doses mais altas de nosso estudo (T2 e T3). Os valores de P obtidos das comparações do teste Tukey são apresentados na tabela 1.

Figura 4. Tempo de desenvolvimento de indivíduos de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, desde o estágio inicial larval até o último estágio de pupa, em cada tratamento: CN (controle negativo), CS (controle com solvente: 0.0ng/larva), T1 (0.007ng/larva), T2 (0.044ng/larva) e T3 (4.375ng/larva). Letras iguais indicam semelhança estatística ($p<0.05$).

Tabela 1. Valores de P obtidos do teste ANOVA seguido do teste Tukey *post hoc*, quanto ao tempo de desenvolvimento dos indivíduos desde a fase inicial larval até o último estágio de pupa, em cada tratamento. Valores de P são significativos ao nível de 0.05. CN (controle negativo), CS (0.0ng/larva), T1 (0.007ng/larva), T2 (0.044ng/larva) e T3 (4.375ng/larva).

Tratamento	CN	CS	T1	T2	T3
CN					
CS	>0.05				
T1	<0.01	<0.05			
T2	<0.001	<0.001	<0.001		
T3	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	

Quanto ao tempo desenvolvimento em cada estágio (figura 5), o teste ANOVA ($F= 48.5$, $p<0.00001$) seguido de Tukey (significativo ao nível de $p<0.05$) indicou distinção entre as larvas, tendo os grupos expostos a T2 e T3 o menor tempo de duração; a duração do estágio de pré-pupa não foi diferente entre os grupos (ANOVA, $F=1.30$, $p>0.5$); e na fase de pupa (ANOVA, $F=38.62$, $p<0.0000$) nas doses mais altas (T2 e T3) os indivíduos apresentaram tempo de desenvolvimento significativamente maior do que os demais. Os valores de P obtidos das comparações do teste Tukey para o tempo de desenvolvimento entre os grupos em estágio larval e de pupa são apresentados na tabela 2.

Figura 5. Tempo de desenvolvimento de indivíduos de *Scaptotrigona* aff. *depilis* em cada fase (representadas pelas colunas), em cada tratamento: CN (controle negativo), CS (controle com solvente: 0.0ng/larva), T1 (0.007ng/larva), T2 (0.044ng/larva) e T3 (4.375ng/larva). Letras diferentes indicam diferença estatística (Teste de Tukey, significativo ao nível de 0.05). A comparação entre as médias indicadas pelas letras é feita entre as colunas correspondentes ao mesmo estágio de desenvolvimento.

Tabela 2. Valores de P obtidos do teste ANOVA seguido do teste Tukey *post hoc*, quanto ao tempo de desenvolvimento dos indivíduos em cada estágio, em cada tratamento. Valores de P são significativos ao nível de 0.05. CN (controle negativo), CS (0.0ng/larva), T1 (0.007ng/larva), T2 (0.044ng/larva) e T3 (4.375ng/larva).

Tratamento		CN	CS	T1	T2	T3
LARVA	CN					
	CS	>0.05				
	T1	>0.05	>0.05			
	T2	<0.001	<0.001	<0.01		
	T3	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05	
PUPA	CN					
	CS	>0.05				
	T1	>0.05	>0.05			
	T2	<0.001	<0.001	<0.001		
	T3	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05	

MORFOMETRIA (DISTÂNCIA INTERTEGULAR, LARGURA DA CABEÇA E ASSIMETRIA DE ASAS)

Indivíduos alimentados com as maiores dosagens de tiametoxam, T2 e T3, exibiram medidas significativamente menores do que aqueles alimentados nos demais grupos, tanto para distância intertegular (figura 6a) quanto para largura da cabeça (figura 6b). Os valores do teste ANOVA e os valores P obtidos das comparações do teste Tukey são apresentados na tabela 3.

Figura 6. Medidas morfométricas (média em milímetros) de operárias de *Scaptotrigona* aff. *depilis* alimentadas com dietas com e sem adição do inseticida tiametoxam. a: distância intertegular; b: largura da cabeça. Colunas representam os tratamentos: CN (controle negativo), CS (controle com solvente: 0.0ng/larva), T1 (0.007ng/larva), T2 (0.044ng/larva) e T3 (4.375ng/larva). Barras indicam os valores de erro padrão das médias. Letras distintas indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Tabela 3. Valores de P obtidos do teste ANOVA seguido do teste Tukey *post hoc*, em cada um dos parâmetros observados: distância intertegular e largura da cabeça. Valores de P são significativos ao nível de 0.05. CN (controle negativo), CS (0.0ng/larva), T1 (0.007ng/larva), T2 (0.044ng/larva) e T3 (4.375ng/larva).

	Distância intertegular (F= 1766.4, p <0.01)	Largura da cabeça (F= 1238.0, p<0.01)
CN x CS	<0.001	<0.0001
CN x T1	<0.001	<0.0001
CN x T2	<0.001	<0.0001
CN x T3	<0.001	<0.0001
CS x T1	>0.05	>0.05
CS x T2	<0.001	<0.0001
CS x T3	<0.001	<0.0001
T1 x T2	<0.001	<0.0001
T2 x T3	<0.001	>0.05

Em relação à morfometria de asas, o teste ANOVA para o tamanho do centroide apresentou diferenças significativas em todos os tratamentos entre os indivíduos, mas não entre o lado esquerdo e direito (tabela 4). Assim, quanto ao tamanho do centroide, não constatamos assimetria das operárias. Em relação aos padrões de venação das asas, analisada pela ANOVA de Procrustes, o controle negativo (CN) e o controle com solvente (CS) apresentam diferença estatística apenas na variação individual, mas não entre os lados, ou seja, os indivíduos desses grupos não apresentam assimetria. O grupo exposto a 0.007ng/larva (T1) apresentou diferença significativa tanto na variação entre indivíduos como na variação entre lados. Além disso, a magnitude dos quadrados médios para ambos os parâmetros avaliados de T1 foi semelhante, indicando que ambos possuem importância para concluirmos que os indivíduos são assimétricos. Nos tratamentos T2 e T3 tanto a variação individual como a variação entre lados foi significativa, mas a magnitude dos quadrados médios entre lados é maior do que entre indivíduos. Ou seja, uma vez que a diferença entre os lados é a principal responsável pela variação de forma, os indivíduos de T2 e T3 também são assimétricos.

Tabela 4. ANOVA do tamanho do centroide e dos padrões de venação para os diferentes tratamentos com tiametoxam. A análise do tamanho do centroide é a ANOVA padrão para assimetria flutuante e a análise dos padrões de venação é a ANOVA de Procrustes correspondente. “Individual”: indica a comparação entre os indivíduos sem distinguir os lados; “Lado” indica a comparação entre o lado esquerdo e direito de um mesmo indivíduo; “Ind*lado” indica a interação entre os efeitos de variação de “individual” e “lado”. Os valores correspondem aos quadrados médios. * P <0.05, ** P < 0.01, *** P <0.0001

	CN	CS	T1	T2	T3
Tamanho do centroide					
Individual	4513,28 ***	2213,18 ***	1352,11***	1756,84***	5675,04***
Lado	7,68	96,61	105,63	1069,78	159,95
Ind * lado	182,14	127,31	123,26	129,89	113,82
Procrustes ANOVA					
Individual	1,526664E-04 ***	1,062255E-05 ***	8,85787E-05***	8,73776E-05 ***	6,8987E-05 ***
Lado	6,24304E-05	3,93180E-05	7,89312E-05**	1,06529E-04 ***	1,248246E-04***
Ind * lado	4,46636E-05	3,68205E-05	3,41252E-05	2,74974E-05	2,56658E-05

DISCUSSÃO

DESENVOLVIMENTO

Nossos resultados indicaram que os indivíduos expostos às maiores dosagens de tiametoxam durante a fase larval (0.044 e 4.375ng/larva) tiveram aumento significativo na taxa de mortalidade, comparativamente ao grupo controle negativo. Nos demais estágios de desenvolvimento (pré-pupa e pupa) não houve diferença entre os tratamentos. Embora tenha havido aumento significativo na mortalidade durante o estágio larval, em todas as dosagens as larvas atingiram a fase adulta.

Tomé et al. (2012) expondo larvas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* ao inseticida imidacloprido constataram que, além do grupo controle, indivíduos expostos a doses entre 5.6 a 112ng i.a./larva conseguiram atingir a fase adulta. Em dosagens iguais ou superiores a 280ng i.a./larva, os indivíduos morreram antes mesmo de atingir a fase de pupa. Embora nosso estudo não tenha abrangido as maiores doses do estudo de Tomé et al. (2012) de maneira que pudéssemos comparar os nossos resultados, podemos observar que as larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* conseguiram atingir a fase adulta quando expostas a dosagens relativamente superiores a nossa superdosagem.

Contrariamente aos resultados de Tomé et al. (2012), nos quais o tempo desenvolvimento dos imaturos não sofreu alteração com exposição ao imidacloprido, nosso estudo evidenciou atraso significativo no desenvolvimento, desde a fase larval inicial até o último estágio de pupa, em indivíduos expostos às duas maiores doses de tiametoxam. Para *A. mellifera*, também foi reportado atraso no desenvolvimento de imaturos em favos contaminados com resíduos de até 17 tipos de pesticidas (incluindo neonicotinóides) (Wu et al., 2011). Em acréscimo,

para outros grupos como a espécie de abelha solitária *Osmia lignaria*, larvas expostas a imidacloprido também evidenciaram atraso até a emergência dos adultos (Abbott et al., 2008).

Uma consideração importante é que, apesar da eficácia biológica de tiametoxam ser comparável a de outros inseticidas neonicotinóides (Nauen et al., 2003), alertamos para o fato de que o experimento de Tomé et al. (2012) utilizou como modelo para estudo uma espécie do gênero *Melipona*, cujas abelhas possuem tamanho relativamente maior do que as do gênero *Scaptotrigona* (Silveira et al., 2002). Assim, uma comparação entre o desenvolvimento dos indivíduos expostos a neonicotinóides entre esses dois grupos deve ser considerada cautelosamente. Além disso, Valdovinos-Nuñez et al. (2009) e Brittain e Potts (2011) destacam que o tamanho do corpo do organismo é um importante parâmetro a ser considerado quanto à susceptibilidade a inseticidas, em exposição por contato através da superfície do corpo: indivíduos menores são mais suscetíveis a pesticidas do que indivíduos maiores. Embora a exposição em nossos experimentos tenha sido administrada através da dieta, devemos considerar que essa informação possa ser estendida para outras formas de exposição.

Em condições naturais, uma colônia de *A. mellifera* apresenta uma taxa de 85% de emergência de ovos postos por uma rainha (Fukuda & Sakagami, 1968). A partir desse dado, Crailsheim et al. (2013) estabeleceram que, para amostras de grupo controle em testes de criação *in vitro* com *A. mellifera*, a taxa de mortalidade deve ser igual ou inferior a 15%. Em nossos experimentos *in vitro* utilizamos a espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis*, e obtivemos uma taxa de 13.2% de mortalidade no grupo controle negativo. Assim, uma vez que constatamos no referido grupo a menor taxa de mortalidade total comparativamente aos demais

tratamentos, nós indicamos a aplicação do método utilizado, para estudos que enfoquem o desenvolvimento de abelhas sem ferrão, expostas a inseticidas durante a fase larval.

MORFOMETRIA (DISTÂNCIA INTERTEGULAR, LARGURA DA CABEÇA E ASSIMETRIA DE ASAS)

As operárias expostas às maiores doses de tiametoxam em nossos testes originaram indivíduos menores, comparativamente ao grupo controle. Levando-se em consideração o tamanho do corpo dos indivíduos quanto à susceptibilidade a inseticidas em exposição por contato (Valdovinos-Nuñez et al., 2009; Brittain & Potts, 2011), se as abelhas menores, evidenciadas pela diminuição da distância intertegular, originadas em decorrência do consumo de tiametoxam durante a fase larval atingirem a idade de forrageio, potencialmente seriam mais suscetíveis aos inseticidas. Além disso, a ingestão de tiametoxam mesmo em nossa menor dosagem indicou assimetria quanto à forma das asas.

Em acréscimo, Higginson e Barnard (2004) constataram que, em *A. mellifera*, o aumento de assimetria em asas resulta em redução na eficiência de voo das operárias. Uma vez que a polinização depende da eficiência de forrageio de operárias (Brittain & Potts, 2011), inferimos que abelhas assimétricas comprometidas quanto à sua atividade de voo, potencialmente trariam prejuízos para esse serviço ecossistêmico fundamental.

Os parâmetros morfométricos utilizados em nosso estudo serviram para apontar efeitos subletais em curto prazo. Assim, evidenciamos a importância da consideração dessas medidas para estudos que abordem a exposição de abelhas em estágio larval a inseticidas, como indicadores de efeitos adversos.

POTENCIAIS IMPLICAÇÕES DECORRENTES DO ATRASO NO DESENVOLVIMENTO DOS IMATUROS E DA FORMAÇÃO DE INDIVÍDUOS MENORES E ASSIMÉTRICOS PARA A COLÔNIA.

Para as dosagens estabelecidas em nossos testes, a mortalidade não foi um parâmetro conclusivo quanto aos potenciais efeitos adversos em abelhas sem ferrão, decorrentes do consumo de tiametoxam. No entanto, o atraso no desenvolvimento dos imaturos e a formação de indivíduos menores e assimétricos indica um alerta quanto ao uso desse ingrediente ativo em cultivos que ofertam flores atrativas para abelhas. A partir disso, concluímos que os efeitos do consumo de tiametoxam provavelmente não sejam evidenciados em curto prazo.

Nesse contexto, Wu et al. (2011) inferem que o atraso no desenvolvimento de operárias de *A. mellifera* expostas a resíduos de pesticidas, incluindo neonicotinóides, poderia trazer consequências negativas em longo prazo. O desenvolvimento tardio de operárias estimulou o adiantamento da atividade de forrageio e como consequência, isso afetaria uma série de atividades, como o cuidado com as crias, o processamento e armazenamento de alimento, o cuidado com a rainha, o comportamento higiênico e a eficiência de forrageio.

Não foi o foco de nosso trabalho monitorar a longevidade das abelhas após a emergência, mas talvez, esses indivíduos provenientes de um desenvolvimento tardio, com corpos menores e assimétricos atinjam a idade adulta, apresentando consequências semelhantes. Isso poderia contribuir para o enfraquecimento da colônia em longo prazo, e trazendo implicações como, por exemplo, a susceptibilidade a doenças.

Decourtye e Devillers (2008) acrescentam que muitos estudos têm abordado os efeitos de neonicotinóides em abelhas adultas, mas alertam que

efeitos adversos nas crias podem ter consequências mais graves para a saúde da colônia do que a perda de abelhas mais velhas, como forrageiras.

DOSES DE TIAMETOXAM EM CONFIGURAÇÃO AMBIENTAL

Nosso trabalho utilizou como base para a escolha das dosagens, os dados apresentados pela EFSA (2012), que nos levou a estabelecer que cada célula de cria devesse receber 0.0192ng de tiametoxam. Entretanto, a nova compilação de estudos apresentada pela EFSA (2013) indicou que o pólen proveniente de sementes tratadas com tiametoxam exibe doses que variam entre 33 a 574µg do ingrediente ativo por kg de pólen em culturas que ofertam flores atrativas para abelhas, como canola e girassol. Se considerarmos esse intervalo para aplicação em nosso estudo, cada célula de cria deveria então conter entre 0.3168ng a 5.5104ng de tiametoxam. Assim, a dosagem de 4.375ng/larva que utilizamos em nossos testes, considerada inicialmente extrapolada, seria a única que estaria contida nesse intervalo de variação. As outras duas dosagens estariam aquém do que pode ser encontrado em condições naturais, considerando os últimos dados apresentados pela EFSA (2013).

A partir da configuração apresentada, evidenciamos a necessidade de estudos complementares de maior abrangência em relação às doses reais de campo, bem como a consideração de outras espécies de abelhas sem ferrão para análises de risco quanto ao uso de inseticidas. Nosso trabalho contribuiu com importantes subsídios para testes de criação *in vitro*, que abordem a exposição de abelhas sem ferrão aos inseticidas durante a fase larval.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela concessão de espaço para o desenvolvimento dos experimentos; ao Prof. Dr. Tiago Maurício Franco pelo espaço no APILAB e suporte nas análises de assimetria flutuante; ao CNPq, pela bolsa de Doutorado.

REFERÊNCIAS

Abbott, V. A., Nadeau, J. L., Higo, H. A., & Winston, M. L. (2008). Lethal and sublethal effects of imidacloprid on *Osmia lignaria* and clothianidin on *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae). *Journal of Economic Entomology*, 101(3), 784-796.

AGROFIT, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). *Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários*. Recuperado em 2 maio, 2014, do AGROFIT Web site: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

Arena, M., & Sgolastra, F. (2014). A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*, 1-11.

Aupinel, P., Medrzycki, P., Fortini, D., Michaud, B., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007a). A new larval *in vitro* rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia XC*, 87-90.

Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Marolleau, F., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007b). Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new *in vitro* standardized feeding method. *Pest management science*, 63(11), 1090-1094.

Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973-992.

Brittain, C., & Potts, S. G. (2011). The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology*, 12(4), 321-331.

Brown, M. J., & Paxton, R. J. (2009). The conservation of bees: a global perspective. *Apidologie*, 40(3), 410-416.

Bookstein, F. L. (1996). Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of mathematical biology*, 58(2), 313-365.

Bosch, J., & Vicens, N. (2002). Body size as an estimator of production costs in a solitary bee. *Ecological Entomology*, 27(2), 129-137.

Charpentier, G., Vidau, C., Ferdy, J. B., Tabart, J., & Vetillard, A. (2014). Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared in vitro. *Pest management science*, 70(1), 140-147.

Costa, M. (2008). Padrões de assimetria ao longo da distribuição geográfica de *Drosophila antonietae* Tindon-Sklorz & Sene. Dissertação de Mestrado, Entomologia, Universidade Federal do Paraná, Paraná.

Costa, E. M., Araujo, E. L., Maia, A. V., Silva, F. E., Bezerra, C. E., & Silva, J. G. (2014). Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Apidologie*, 45(1), 34-44.

Crailsheim, K., Brodschneider, R., Aupinel, P., Behrens, D., Genersch, E., Vollmann, J., & Riessberger-Gallé, U. (2013). Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *Journal of Apicultural Research*, 52, 1.

Cresswell, J. E. (2011). A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1), 149-157.

do Carmo Zerbo, A., Lúcia, R., Silva de Moraes, M., & Regina Brochetto-Braga, M. (2001). Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Apidia, Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(1), 139-147.

Dongen, S. V. (2006). Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. *Journal of evolutionary biology*, 19(6), 1727-1743.

European Food Safety Authority (EFSA) (2012). Statement on the findings in recent studies investigating sub-lethal effects in bees of some neonicotinoids in consideration of the uses currently authorised in Europe. *EFSA Journal*, 10: 2668.

European Food Safety Authority (EFSA) (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. *EFSA Journal*, 11, 3067.

Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., & Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4), 719-731.

Faria, L. B. D., Aleixo, K. P., Garófalo, C. A., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Silva, C. I. D. (2012). Foraging of *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae) in an urbanized area: Seasonality in resource availability and visited plants. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012.

Feltham, H., Park, K., & Goulson, D. (2014). Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology*, 1-7.

Fukuda, H., & Sakagami, S. F. (1968). Worker brood survival in honeybees. *Researches on Population Ecology*, 10(1), 31-39.

Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105-108.

Goulson, D. (2013). Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987.

Hartfelder, K., Makert, G. R., Judice, C. C., Pereira, G. A., Santana, W. C., Dallacqua, R., & Bitondi, M. M. (2006). Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie*, 37(2), 144.

Hendriksma, H. P., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2011). Honey bee risk assessment: new approaches for *in vitro* larvae rearing and data analyses. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(5), 509-517.

Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., ... & Decourtye, A. (2008). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.

Higginson, A. D., & Barnard, C. J. (2004). Accumulating wing damage affects foraging decisions in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Ecological Entomology*, 29(1), 52-59.

Hopwood, J., Vaughan, M., Shepherd, M., Biddinger, D., Mader, E., Black, S. H., & Mazzacano, C. (2012). Are Neonicotinoids Killing Bees? A Review of Research into the Effects of Neonicotinoid Insecticides on Bees, with Recommendations for Action. 40pp. Portland, OR: The Xerces Society for Invertebrate Conservation. *The Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland, OR.*

Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2010). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2897-2908.

Klingenberg, C. P., McIntyre, G. S., & Zaklan, S. D. (1998). Left–right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1402), 1255-1259.

Klingenberg, C. P., Barluenga, M., & Meyer, A. (2002). Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution*, 56(10), 1909-1920.

Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353-357.

Kremen, C., Williams, N. M., & Thorp, R. W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16812-16816.

Köhler, H. R., & Triebskorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond?. *Science*, 341(6147), 759-765.

Lima, M. A. P., Pires, C. S. S., Guedes, R. N. C., Nakasu, E. Y. T., Lara, M. S., Fontes, E. M. G., ... & Campos, L. A. O. (2011). Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee?. *Journal of Applied Entomology*, 135(6), 415-422.

Lima, M. A. P., Pires, C. S. S., Guedes, R. N. C., & Campos, L. A. O. (2013). Lack of lethal and sublethal effects of Cry1Ac Bt-toxin on larvae of the stingless bee *Trigona spinipes*. *Apidologie*, 44(1), 21-28.

Maienfish, P., Huerlimann, H., Rindlisbacher, A., Gsell, L., Dettwiler, H., Haettenschwiler, J., ... & Walti, M. (2001). The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. *Pest management science*, 57(2), 165-176.

Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L., Chauzat, M. P., Classen, C., ... & Vidau, C. (2013). Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*.

Menezes, C., Vollet-Neto, A., & Fonseca, V. L. I. (2013). An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. *Apidologie*, 44(5), 491-500.

Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (2013). *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region*. Recuperado em 2 maio, 2014, do Web site: <http://moure.cria.org.br/>

Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V. L., & Kaussmann, M. (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 76(2), 55-69.

Nogueira-Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis.

Palmer, A. R., & Strobeck, C. (1986). Fluctuating asymmetry: measurement, analysis, patterns. *Annual review of Ecology and Systematics*, 391-421.

Peng, Y. S. C., Mussen, E., Fong, A., Montague, M. A., & Tyler, T. (1992). Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared *in vitro*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(2), 127-133.

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

Rohlf, F. J. (2008a). tpsUtil [cd rom]. New York - USA: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.

Rohlf, F. J. (2008b) tpsDig [cd rom]. New York - USA: Department of Ecology and Evolution, State University of New York.

Rortais, A., Arnold, G., Halm, M. P., & Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36(1), 71-83.

Silveira, F. A., Melo, G. A., Almeida, E. A. (2002). Abelhas brasileiras. Sistemática e Identificação. Belo Horizonte: Fundação Araucária.

Tomé, H. V. V., Martins, G. F., Lima, M. A. P., Campos, L. A. O., & Guedes, R. N. C. (2012). Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PloS one*, 7(6), e38406.

Valdovinos-Núñez, G. R., Quezada-Euán, J. J. G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H., Carmona, A., & Sánchez, E. R. (2009). Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of economic entomology*, 102(5), 1737-1742.

Van der Sluijs, J. P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J. M., & Belzunces, L. P. (2013). Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current opinion in environmental sustainability*, 5(3), 293-305.

Villa, S., Vighi, M., Finizio, A., & Serini, G. B. (2000). Risk assessment for honeybees from pesticide-exposed pollen. *Ecotoxicology*, 9(4), 287-297.

Wilkins, S., Jarratt, N., Harkin, S., Thompson, H., & Coulson, M. (2013). Effects of solvent on the toxicity of dimethoate in a honey bee in vitro larval study. *Pest management science*, 69(4), 462-463.

Wu, J. Y., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, 6(2), e14720.

CAPÍTULO 4

ABELHAS SEM FERRÃO COMO POTENCIAIS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR PESTICIDAS

**ANNELISE DE SOUZA ROSA, MARIA JULIANA FERREIRA
CALIMAN, ELISA PEREIRA QUEIRÓZ, CARMEM SÍLVIA
SOARES PIRES E VERA LÚCIA IMPERATRIZ-FONSECA.**

ABELHAS SEM FERRÃO COMO POTENCIAIS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR PESTICIDAS

INTRODUÇÃO

Inseticidas neonicotinóides tem sido foco de diversos estudos em função da sua utilização em várias partes do mundo e do seu potencial prejuízo para populações de abelhas (Thompson, 2010). Atualmente, os neonicotinóides são aplicados em diversos cultivos, incluindo àqueles que ofertam floração em massa para abelhas, tais como canola, algodão, girassol e soja (Elbert et al., 2008; AGROFIT, 2014).

A ação sistêmica dos neonicotinóides faz com que resíduos sejam detectados no pólen e no néctar provenientes de flores (Dively & Kamel, 2012; Stoner & Eitzer, 2012; Kasiotis et al., 2014; Yañez et al., 2014), no pólen e no mel armazenados nas colônias (Bernal et al., 2010; Kamel, 2010; Tanner & Czerwenka, 2011; Krupke et al., 2012; Pohorek et al., 2012; Giroud et al., 2013; Kasiotis et al., 2014; Paradis et al., 2014), nas cargas de pólen das abelhas (Chauzat et al., 2006) e em favos de cria (Wu et al., 2011). Dessa forma, existem várias possibilidades quanto a rotas de exposição das abelhas a esses inseticidas e a ingestão parece ser o principal veículo de contato entre inseticidas sistêmicos e abelhas (Rortais et al., 2005; Blacquièrre et al., 2012).

Após a ingestão de recursos contaminados, resíduos permanecem em diferentes compartimentos no corpo de abelhas *Apis mellifera* (Suchail et al., 2004; Brunet et al., 2005) e o tempo de persistência dependerá da capacidade do metabolismo desses insetos (Cresswell et al., 2013). O trato digestivo dessas abelhas é o principal sítio de metabolismo de pesticidas ingeridos e de interações

químicas influenciadas especialmente por enzimas detoxificadoras (Thompson, 2012). Suchail et al. (2004) constataram eliminação de resíduos e de seus metabolitos 6 e 24 horas após a ingestão do neonicotinóide imidacloprido a 20 e 50 µg do ingrediente ativo (i.a.) por quilograma de indivíduos de *A. mellifera*, respectivamente. Cresswell et al. (2013), compararam a eliminação de do neonicotinóide imidacloprido por abelhas das espécies *A. mellifera* e *Bombus terrestris audax* após exposição de 72 horas à dieta contaminada seguida de exposição à dieta livre de inseticida. Os autores constataram eliminação diária de 100% para a primeira espécie, e os indivíduos de *B. terrestris* levaram 48 horas após a retirada de imidacloprido da dieta para eliminar os resíduos do seu corpo.

Nesse contexto, uma série de estudos tem concentrado seus esforços no desenvolvimento de métodos analíticos para detecção e quantificação de resíduos de neonicotinóides no corpo de abelhas coletadas nas proximidades ou em áreas que fazem o uso de neonicotinóides em culturas (Rancan et al., 2006; Girotti et al., 2010; Pohoreka et al., 2012; Tapparo et al., 2013). À exceção de Cresswell et al. (2013) e Sanchez-Bayo e Goka (2014), que abordaram também a presença de resíduos em *B. terrestris*, os estudos que enfocam esse tema abordam essencialmente a espécie *A. mellifera*. Porém, Kremen et al. (2002) destacam a importância de abelhas nativas como polinizadoras de cultivos agrícolas e a possibilidade de exposição a pesticidas como consequência.

No Brasil, a espécie nativa de abelha sem ferrão *Scaptotrigona aff. depilis* visita uma ampla gama de recursos florais (Faria et al., 2012) e sua distribuição abrange diversas regiões do país (Moure et al., 2013), onde é permitida a aplicação de inseticidas neonicotinóides (AGROFIT, 2014). Assim, essa espécie é um potencial modelo de investigação quanto aos possíveis danos causados pelo

uso desses inseticidas. Além disso, na literatura não existem métodos acerca da extração e detecção de resíduos para espécies de abelhas sem ferrão. A facilidade de manejo das colônias e de obtenção de enxames, e sua resistência à manipulação humana (Menezes, 2010) facilitam a obtenção de indivíduos de *Scaptotrigona* aff. *depilis* para experimentação.

Para nosso estudo, escolhemos dois importantes neonicotinóides, imidacloprido e tiametoxam, a serem monitorados em abelhas da espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis*. O trabalho teve como objetivo (i) detectar os compostos em abelhas coletadas no *campus* da USP; (ii) monitorar o tempo de desintoxicação do imidacloprido nas abelhas e; (iii) avaliar a possibilidade de operárias dessa espécie serem utilizadas como indicadoras de contaminação ambiental por pesticidas.

MATERIAL E MÉTODOS

LOCAL, ESPÉCIE ESTUDADA E INSETICIDAS MONITORADOS

Operárias forrageiras de *Scaptotrigona* aff. *depilis* foram coletadas na entrada dos ninhos de colônias (n=100 indivíduos/colônia) mantidas no meliponário da Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto, Brasil. Amostras paralelas foram coletadas em dois ninhos naturais (n=100 indivíduos/ninho), em área externa ao *campus* da USP, distantes a aproximadamente 3km do meliponário. Os neonicotinóides utilizados nesse trabalho, tiametoxam (TMX) e imidacloprido (IMI), foram obtidos da Sigma Aldrich, UK (Pestanal®, analytical standard – Fluka).

INSTRUMENTAÇÃO

As análises químicas foram conduzidas no Laboratório de Química Analítica, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, *campus* de Ribeirão Preto. O sistema de cromatografia líquida consistiu de uma bomba LC10AD e uma coluna CTO-10AS. Para a separação dos compostos foi utilizada a coluna C18 (Agilent ZORBAX Rapid Resolution Eclipse Plus C18 Analytical 4.6x150mm 5-mícron; Agilent Technologies). A detecção foi obtida através de um espectrômetro de massas Quattro Micro LC (Micromass, Manchester,UK) equipado com uma interface de electrospray (ESI) e fonte de massa operado no modo íon positivo.

PARÂMETROS DE DETECÇÃO DOS COMPOSTOS NO ESPECTRÔMETRO

Para o estabelecimento dos parâmetros de detecção, 50mg de tiametoxam foram dissolvidos em 2ml de água e o volume para 50ml foi preenchido com metanol. Para imidacloprido, foi colocado 20mg da substância em balão volumétrico, dissolvido em 1ml de água e o volume de 50ml foi completado com metanol. A partir disso, obtivemos 100µg do ingrediente ativo de cada composto por ml de solução. Ambas as soluções foram utilizadas para infusão no espectrômetro de massas. Para a infusão das soluções, de cada uma foi retirada uma amostra de 0.5ml e acrescentado 0.5ml de solução de fase móvel: MeOH:H₂O (50:50, v/v) + 0.5% ácido acético. Previamente às infusões de quaisquer amostras no espectrômetro, era essencial a infusão de fase móvel para certificação de que o equipamento estava limpo e livre de qualquer contaminação (figura 1).

Para a detecção das moléculas dos compostos no espectrômetro de massas, nos baseamos nos resultados analíticos apresentados por Kamel (2010) e adaptamos as condições ao equipamento utilizado em nosso estudo. O tempo de retenção dos compostos, as transições dos íons, e as condições do espectrômetro são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros do espectrômetro de massas para a detecção das substâncias tiametoxam e imidacloprido. TR: tempo de retenção; EC: energia de colisão.

Substância	TR	Transição 1	EC	Transição 2	EC
Tiametoxam	3.39	292>132	19	292>211	31
Imidacloprido	3.89	256>175	23	256>209	21

Figura 1. Cromatograma de infusão de fase móvel, acompanhados pela informação dos íons de transição primário ou secundário, que estão sendo monitorados nas amostras. O eixo X representa o tempo de retenção dos íons e o eixo Y, a intensidade do sinal. **a:** monitoramento e não detecção de tiametoxam; **b:** monitoramento e não detecção de imidacloprido.

ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS INGREDIENTES ATIVOS DAS AMOSTRAS

Avaliamos a extração de tiametoxam e imidacloprido, utilizando abelhas sem contaminação, a partir de quatro experimentos: (1) infusão de 0.5ml de cada solução de TMX e IMI em concentração de 100µg /ml; (2) infusão de 0.5ml das mesmas soluções com acréscimo de 10ml de acetona, seguido de secagem e adição de 250µl de fase móvel; (3) infusão de uma amostra de 20 abelhas que permaneceram por 12 horas em contato com 0.5ml de cada solução de TMX e IMI. Antes da infusão foram acrescentados 10ml de acetona e a amostra passou pelo procedimento de extração, seguido de adição de 250µl de fase móvel; (4) infusão de uma amostra de 20 abelhas colocadas em 10ml de acetona com adição de 0.5ml de cada solução (TMX e IMI). Foi procedida a extração e a adição de 250µl de fase móvel.

COLETA DE ABELHAS NO MELIPONÁRIO E EM ÁREA EXTERNA AO CAMPUS DA USP

Entre os meses de Janeiro a Março de 2014, coletamos operárias forrageiras de *Scaptotrigona* aff. *depilis* aleatoriamente, na entrada de cinco diferentes colônias no meliponário, identificadas como A, B, C, D e E. Paralelamente, coletamos amostras de abelhas de dois ninhos naturais, identificados como F e G, a aproximadamente 3km de distância do meliponário da USP. Todas as amostras foram imediatamente congeladas após a coleta, a -80°C e armazenadas até as análises.

TEMPO DE DESINTOXICAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO PELAS ABELHAS

Após a detecção de imidacloprido nas amostras obtidas de A, B e C, realizamos novas coletas nas mesmas colônias e, com o objetivo de monitorar o tempo de desintoxicação do composto, confinamos as abelhas em caixas de plástico (0.08 x 0.135 x 0.18 m) e acomodamos em estufa, com temperaturas entre 25 e 28°C e umidade relativa entre 40 e 50%. Cada caixa continha 30 abelhas provenientes de uma mesma colônia, observadas através de tecido de malha fina instalado na parte superior, para circulação de ar. Os indivíduos se alimentaram livremente através de xarope ofertado em tubo falcon com capacidade para 15 ml. O tempo de confinamento foi dividido em dois grupos: indivíduos das colônias A e B foram confinados por 24 horas; indivíduos das colônias A, B e C foram confinados por 96 horas. Imediatamente ao final do período experimental, as abelhas foram coletadas, congeladas a -80°C e armazenadas até as análises.

A ideia do confinamento para a obtenção de amostras brancas teve origem a partir de trabalhos que indicaram a eliminação de resíduos de imidacloprido em operárias de *A. mellifera* após 24 horas mantidas em condições controladas (Suchail et al., 2001; Suchail et al., 2004; Cresswell et al., 2013). Dessa forma, adaptamos essa informação para *Scaptotrigona* aff. *depilis*, submetendo as operárias a 24 e 96 horas de confinamento, uma vez que as espécies diferem em fatores como tamanho e peso do corpo, o que poderia influenciar a capacidade de desintoxicação.

RESULTADOS

PARÂMETROS DE DETECÇÃO DOS COMPOSTOS NO ESPECTRÔMETRO

Foi possível a detecção das moléculas dos compostos no espectrômetro de massas através da infusão de uma amostra de 0.5ml da solução de 100µg/ml (de cada composto) adicionada a 0.5ml de solução de fase móvel (figura 2).

Figura 2. Cromatogramas acompanhados pela informação dos dos íons de transição primário ou secundário, que estão sendo monitorados nas amostras. O eixo X representa o tempo de retenção dos íons e o eixo Y, a intensidade do sinal. **a:** detecção dos compostos tiametoxam e imidacloprido, diluídos em solução de 100µg/ml; **b:** infusão de fase móvel antes e depois das infusões dos compostos, mostrando a não detecção dos mesmos e a consequente limpeza do equipamento.

ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS

A leitura das amostras no espectrômetro de massas de acordo com os procedimentos testados (figuras 3a-d) nos permitiu estabelecer, como método de extração de resíduos em operárias de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, o seguinte protocolo para cada amostra: 20 abelhas devem ser colocadas em tubo falcon com capacidade para 50ml e adicionados 10ml de acetona. As amostras devem então, ser trituradas com homogenizador de tecidos (OMNI TH) durante 1min 30s. Em seguida, as amostras devem ser centrifugadas por 15 min a 4000 rpm e 4°C e após, ser retirado o sobrenadante. O mesmo deve ser filtrado em filtro de 0.20µm (Minisart RC15, 15mm diâmetro, não estéril), transferido para tubo de ensaio, e colocado para evaporar em ar comprimido. Logo após, deve ser acrescentado 250µl da solução de fase móvel em cada tubo e as amostras então devem ser injetadas no espectrômetro.

Figura 3. Cromatogramas apresentando a detecção dos compostos tiametoxam e imidacloprido, de acordo com os procedimentos de extração adotados no estudo. O eixo X representa o tempo de retenção dos íons e o eixo Y, a intensidade do sinal. **a:** infusão de solução de ambos os compostos em concentração de 100µg/ml; **b:** infusão da solução de ambos os compostos com adição de 10ml de acetona; **c:** infusão de amostras provenientes da extração de abelhas previamente em contato com os compostos, durante 12 horas; **d:** infusão de amostras provenientes da extração de abelhas colocadas em contato com os compostos imediatamente antes da injeção. Os cromatogramas são acompanhados pela informação dos íons de transição primário ou secundário, que estão sendo monitorados nas amostras.

COLETA DE ABELHAS NO MELIPONÁRIO E EM ÁREA EXTERNA AO CAMPUS DA USP

As amostras coletadas do meliponário, imediatamente congeladas até as análises (sem passar por período de desintoxicação), confirmaram a presença de imidacloprido em três das cinco amostras (figura 4). Em uma delas foi detectada a presença de tiametoxam (figura 5a) e apenas uma amostra estava livre de contaminação (figura 5b). As abelhas coletadas de ninhos naturais também imediatamente congeladas até as análises (sem passar por período de desintoxicação), distantes aproximadamente 3km do meliponário, não apresentaram detecção de imidacloprido (figura 6).

Figura 4. Cromatogramas indicando a detecção de imidacloprido em abelhas coletadas no meliponário, provenientes das colônias **A**, **B** e **C**. Todas as abelhas correspondem a amostras coletadas e imediatamente congeladas até as análises, sem terem passado por período de desintoxicação. Cada cromatograma é acompanhado pela informação dos dos íons de transição primário ou secundário, que estão sendo monitorados nas amostras. O eixo X representa o tempo de retenção dos íons e o eixo Y, a intensidade do sinal.

Figura 5. Cromatogramas de amostras coletadas no meliponário. **a:** detecção de tiametoxam em abelhas provenientes da colônia **D**; **b:** abelhas provenientes da colônia **E** livres de contaminação. Todas as abelhas correspondem a amostras coletadas e imediatamente congeladas até as análises, sem terem passado por período de desintoxicação. Cada cromatograma é acompanhado pela informação dos dos íons de transição primário ou secundário, que estão sendo monitorados nas amostras. O eixo X representa o tempo de retenção dos íons e o eixo Y, a intensidade do sinal.

Figura 6. Amostras de operárias forrageiras da espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis*, coletadas em ninhos naturais, a aproximadamente 3km de distância do meliponário da USP. Os cromatogramas provenientes das colônias **F** e **G** indicam que as abelhas estão livres de contaminação de tiametoxam e imidacloprido. Todas as abelhas correspondem a amostras coletadas e imediatamente congeladas até as análises, sem terem passado por período de desintoxicação. Cada cromatograma é acompanhado pela informação dos íons de transição primário ou secundário, que estão sendo monitorados nas amostras. O eixo X representa o tempo de retenção dos íons e o eixo Y, a intensidade do sinal.

TEMPO DE DESINTOXICAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO PELAS ABELHAS

Abelhas provenientes das amostras contaminadas (colônias A e B), confinadas com oferta de xarope puro por 24 horas ainda apresentaram picos do composto (figuras 7a e b). Abelhas provenientes das amostras contaminadas (colônias A, B e C), do grupo confinado por 96 horas, não apresentaram mais o composto (figuras 8a e b).

Figura 7. Cromatogramas mostrando que, após 24 horas de confinamento, as abelhas provenientes do meliponário ainda apresentam contaminação por imidacloprido. **a:** amostras coletadas e imediatamente congeladas até as análises, sem terem passado por período de desintoxicação; **b:** amostras coletadas e confinadas por 24 horas. Cada cromatograma é acompanhado pela informação dos dos íons de transição primário ou secundário, que estão sendo monitorados nas amostras. O eixo X representa o tempo de retenção dos íons e o eixo Y, a intensidade do sinal.

Figura 8. Cromatogramas mostrando que, após 96 horas de confinamento, as abelhas provenientes do meliponário não apresentam mais a contaminação por imidacloprido. **a:** amostras coletadas e imediatamente congeladas até as análises, sem terem passado por período de desintoxicação; **b:** amostras coletadas e confinadas por 96 horas. Cada cromatograma é acompanhado pela informação dos dos íons de transição primário ou secundário, que estão sendo monitorados nas amostras. O eixo X representa o tempo de retenção dos íons e o eixo Y, a intensidade do sinal.

DISCUSSÃO

MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS NO CORPO DE ABELHAS

A literatura apresenta métodos de extração, detecção e quantificação de resíduos no corpo de abelhas *A. mellifera* (Girotti et al., 2010; Pohoreka et al., 2012; Tapparo et al., 2013; Cresswell et al., 2013; Sanchez-Bayo & Goka, 2014) e de *B. terrestris* (Cresswell et al., 2013, Sanchez-Bayo & Goka, 2014). Entretanto, para abelhas sem ferrão nenhuma abordagem foi realizada até o momento com esse enfoque. Em nosso estudo, atingimos um procedimento para a extração e detecção de resíduos no corpo de abelhas da espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis* e sua aplicação e/ ou adaptação para outras espécies de abelhas sem ferrão pode ser considerada.

A padronização de metodologias para análises químicas para esse grupo de abelhas é importante. Dessa forma, daremos continuidade aos procedimentos já estabelecidos nesse estudo quanto à detecção, com a finalidade de atingirmos também um procedimento de quantificação de resíduos em abelhas sem ferrão.

DETECÇÃO DOS COMPOSTOS EM ABELHAS COLETADAS NO CAMPUS DA USP

Através do estabelecimento do método de extração dos compostos no corpo de abelhas, foi possível analisar as amostras provenientes do meliponário da USP e detectar que, das cinco, quatro estavam contaminadas com neonicotinóides. Além disso, foi possível constatar que as amostras coletadas fora do meliponário da USP estavam livres de contaminação.

Faria et al. (2012), através da análise do pólen coletado por *Scaptotrigona* aff. *depilis* registraram a visitação dessa espécie em uma ampla gama de recursos florais dentro do *campus* da USP. Num raio de 500m demarcado a partir do meliponário, Aleixo et al. (no prelo), realizaram o levantamento de 289 espécies de plantas, dentre as quais, muitas ofertam flores para abelhas. De alguma maneira, essas flores poderiam estar sendo contaminadas e, conseqüentemente, atingindo as operárias forrageiras de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, as quais tem o raio de voo estimado em 903m (Lichtenberg et al., 2010).

É importante também considerar o vento como possível dispersor de substâncias ativas provenientes de pulverização foliar, advindas de áreas aos arredores do *campus*. Além disso, os resíduos de pó liberados durante o plantio de sementes tratadas com neonicotinóides também pode ser conduzido pelo vento, atingindo flores que podem ser atrativas para abelhas (Roubos et al., 2014).

TEMPO DE DESINTOXICAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO PELAS ABELHAS

Através de nossos testes, conseguimos obter abelhas livres de contaminação por imidacloprido com quatro dias de confinamento, previamente contaminadas com o composto. Suchail et al. (2004) constataram que 24 horas após a exposição ao imidacloprido (50µg i.a./kg de abelhas), as abelhas da espécie *A. mellifera* não apresentaram mais o ingrediente ativo nem os seus metabólitos. Considerando, por exemplo, o tamanho do corpo como parâmetro relevante quanto à susceptibilidade a inseticidas (Brittain & Potts, 2011), em abelhas sem ferrão a persistência dos compostos no corpo das abelhas pode se comportar de maneira diferente. Outro ponto importante é que a concentração em que a

substância ativa será ingerida pode ser um fator determinante quanto à capacidade de eliminação (Suchail et al., 2004).

Além disso, a possibilidade da toxicidade dos metabólitos desses compostos para abelhas sem ferrão será considerada para a sequência do trabalho. Di Prisco et al. (2013) reportaram que a clotianidina, um dos metabólitos de tiametoxam é tóxica para a espécie *A. mellifera*, promovendo a replicação de um patógeno viral que deforma as asas e induz a infecções não detectadas facilmente.

Para monitorar o tempo de eliminação de uma substância no corpo desses indivíduos, os parâmetros de quantificação desses compostos são essenciais (Rancan et al., 2006; Kamel, 2010). Dessa forma, será dada a continuidade aos procedimentos já estabelecidos nesse estudo, com intuito de atingir um método de quantificação dos resíduos, o que permitirá o monitoramento da desintoxicação desses compostos pelas abelhas.

CONSIDERAÇÕES QUANTO À DETECÇÃO DE ABELHAS CONTAMINADAS NO MELIPONÁRIO DA USP

É importante destacar que a origem da contaminação das abelhas coletadas para nosso estudo no meliponário é uma questão ainda em aberto. O que apresentamos aqui foram apenas considerações sobre as possíveis fontes de contaminação de nossas amostras, e advertimos a necessidade de profunda investigação do assunto. Além da criação racional de abelhas, em meliponário e apiário, sabe-se que o *campus* da USP abriga ninhos naturais de diversas espécies de abelhas sem ferrão (de Freitas et al., 2009). Alertamos para o fato de que efeitos letais diretos em abelhas, ocasionados pela contaminação de resíduos de neonicotinóides são incomuns (Cresswell, 2011). Assim, a mortalidade de abelhas

pode não ser observada em primeira instância, porém, a constatação de efeitos subletais ocasionados por esses inseticidas tem sido cada vez mais evidenciada a partir de estudos que vem sendo conduzidos gradativamente (Desneux et al., 2007; Gill et al., 2012; Henry et al., 2012; Pettis et al., 2013; Feltham et al., 2014).

Wu et al. (2011) reportaram uma série de implicações em abelhas da espécie *A. mellifera*, quando os indivíduos em estágio larval foram expostos a pesticidas, incluindo neonicotinóides. Como consequência, os autores inferem a possibilidade das colônias se tornarem fracas e suscetíveis a doenças. Dessa forma, para as abelhas sem ferrão presentes no *campus* da USP, a possibilidade dos neonicotinóides detectados propiciarem efeitos cumulativos às colônias e dos potenciais prejuízos serem observados em longo prazo deve ser considerada.

Com os resultados obtidos em nosso trabalho, alertamos para a importância de que qualquer estudo a ser conduzido com a utilização de abelhas do meliponário e outras localidades do *campus* da USP, que abordem resíduos de pesticidas, devam realizar procedimentos piloto submetendo amostras prévias a testes para checagem de contaminação.

OPERÁRIAS DE *SCAPTOTRIGONA* AFF. *DEPILIS* COMO INDICADORAS DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR PESTICIDAS

Nossos resultados de extração e detecção dos compostos, somados à facilidade de manejo das colônias, nos permitiram considerar a espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis* como alternativa para indicação de contaminação ambiental por pesticidas. Pesquisas com esse enfoque possibilitarão o acompanhamento, a persistência dos compostos no corpo das abelhas, bem como

a elaboração de propostas para a inclusão de protocolos de monitoramento da toxicidade de neonicotinóides em abelhas sem ferrão.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo espaço concedido para a realização das análises químicas. Aos professores Dr. Jonas Augusto Paschoal e Norberto Peporine Lopes, e à técnica Dra. Valquíria Jabor, desta Faculdade, pela orientação na condução das amostras e realização dos testes analíticos. À MSc. Morgana Silveira Sazam, pelo auxílio nas coletas. À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela utilização de abelhas do meliponário. Ao CNPq pela bolsa de Doutorado.

REFERÊNCIAS

AGROFIT, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2014). *Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários*. Recuperado em 2 maio, 2014, do AGROFIT Web site: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons

Aleixo, K. P., Faria, L. B., Groppo, M., Castro, M. M. N., Silva, C. I. (no prelo). Spatiotemporal distribution of floral resources in a Brazilian city: implications for the maintenance of pollinators, especially bees. *Urban Forestry & Urban Greening*.

Bernal, J., Garrido-Bailon, E., Del Nozal, M. J., Gonzalez-Porto, A. V., Martin-Hernandez, R., Diego, J. C., ... & Higes, M. (2010). Overview of pesticide

residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology*, 103(6), 1964-1971.

Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973-992.

Brittain, C., & Potts, S. G. (2011). The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology*, 12(4), 321-331.

Brunet, J. L., Badiou, A., & Belzunces, L. P. (2005). *In vivo* metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. *Pest management science*, 61(8), 742-748.

Chauzat, M. P., Faucon, J. P., Martel, A. C., Lachaize, J., Cougoule, N., & Aubert, M. (2006). A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*, 99(2), 253-262.

Cresswell, J. E. (2011). A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honey bees. *Ecotoxicology*, 20(1), 149-157.

Cresswell, J. E., Robert, F. X. L., Florance, H., & Smirnoff, N. (2013). Clearance of ingested neonicotinoid pesticide (imidacloprid) in honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest management science*, 70(2), 332-337.

de Freitas, G. S., de Assis, A. F., de Souza, C. C. M., de Sousa, J., Soares, A. E. E. (2009). O doce lar das abelhas indígenas sem ferrão. *Mensagem Doce*, 100, 15-20.

Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J. M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.*, 52, 81-106.

Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., ... & Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), 18466-18471.

Dively, G. P., & Kamel, A. (2012). Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4449-4456.

Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., & Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest management science*, 64(11), 1099-1105.

Faria, L. B. D., Aleixo, K. P., Garófalo, C. A., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Silva, C. I. D. (2012). Foraging of *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae) in an urbanized area: Seasonality in resource availability and visited plants. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012.

Feltham, H., Park, K., & Goulson, D. (2014). Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. *Ecotoxicology*, 1-7.

Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105-108.

Girotti, S., Maiolini, E., Ghini, S., Eremin, S., & Manes, J. (2010). Quantification of imidacloprid in honeybees: development of a chemiluminescent ELISA. *Analytical Letters*, 43(3), 466-475.

Giroud, B., Vauchez, A., Vulliet, E., Wiest, L., & Buleté, A. (2013). Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1316, 53-61.

Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., ... & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.

Kamel, A. (2010). Refined Methodology for the Determination of Neonicotinoid Pesticides and Their Metabolites in Honey Bees and Bee Products by Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)†. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 5926-5931.

Kasiotis, K. M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., & Machera, K. (2014). Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of The Total Environment*, 485, 633-642.

Kremen, C., Williams, N. M., & Thorp, R. W. (2002). Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 16812-16816.

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

Lichtenberg, E. M., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Nieh, J. C. (2010). Behavioral suites mediate group-level foraging dynamics in communities of tropical stingless bees. *Insectes sociaux*, 57(1), 105-113.

Menezes, C. (2010). A produção de rainhas e a multiplicação de colônias em *Scaptotrigona* aff. *depilis* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tese de Doutorado, Entomologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Moure, J. S., Urban, D., Melo, G. A. R. (2013). *Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region*. Recuperado em 2 maio, 2014, do Web site: <http://moure.cria.org.br/>

Paradis, D., Bérail, G., Bonmatin, J. M., & Belzunces, L. P. (2014). Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(2), 621-633.

Pettis, J. S., Lichtenberg, E. M., Andree, M., Stitzinger, J., & Rose, R. (2013). Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS one*, 8(7), e70182.

Pohorecka, K., Skubida, P., Miszczak, A., Semkiw, P., Sikorski, P., Zagibajło, K., ... & Bober, A. (2012). Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *Journal of Apicultural Science*, 56(2), 115-134.

Rancan, M., Rossi, S., & Sabatini, A. G. (2006). Determination of thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor. *Journal of Chromatography a*, 1123(1), 60-65.

Rortais, A., Arnold, G., Halm, M. P., & Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36(1), 71-83.

Roubos, C. R., Rodriguez-Saona, C., & Isaacs, R. (2014). Mitigating the effects of insecticides on arthropod biological control at field and landscape scales. *Biological Control*.

Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide Residues and Bees—A Risk Assessment. *PloS one*, 9(4), e94482.

Stoner, K. A., & Eitzer, B. D. (2012). Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS One*, 7(6), e39114.

Suchail, S., Guez, D., & Belzunces, L. P. (2001). Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(11), 2482-2486.

Suchail, S., De Sousa, G., Rahmani, R., & Belzunces, L. P. (2004). *In vivo* distribution and metabolisation of ¹⁴C-imidacloprid in different compartments of *Apis mellifera* L. *Pest management science*, 60(11), 1056-1062.

Tanner, G., & Czerwenka, C. (2011). LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: Methodology and residue findings in Austrian honeys. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12271-12277.

Tapparo, A., Giorio, C., Soldà, L., Bogialli, S., Marton, D., Marzaro, M., & Girolami, V. (2013). UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(2-3), 1007-1014.

Thompson, H. M. (2010). Risk assessment for honey bees and pesticides—recent developments and ‘new issues’. *Pest Management Science*, 66(11), 1157-1162.

Thompson, H. M. (2012). *Interaction between pesticides and other factors in effects on bees*. (External Scientific Report, Report No.: EN-340). EU: Food and Environment Research Agency.

Wu, J. Y., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, 6(2), e14720.

Yáñez, K. P., Martín, M. T., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2014). Trace Analysis of Seven Neonicotinoid Insecticides in Bee Pollen by Solid–Liquid Extraction and Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 7(2), 490-499.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO GERAL

**CONSIDERAÇÕES FINAIS E POTENCIAIS
ALTERNATIVAS MITIGATÓRIAS PARA EFEITOS
DE NEONICOTINÓIDES EM ABELHAS, COM
ÊNFASE EM ABELHAS SEM FERRÃO.**

ANNELISE DE SOUZA ROSA E VERA LÚCIA IMPERATRIZ-FONSECA

CONSIDERAÇÕES FINAIS E POTENCIAIS ALTERNATIVAS MITIGATÓRIAS PARA EFEITOS DE NEONICOTINÓIDES EM ABELHAS, COM ÊNFASE EM ABELHAS SEM FERRÃO.

1. PROTOCOLOS PADRONIZADOS EXISTENTES PARA ESTUDOS DE TOXICIDADE

O principal veículo de contato entre abelhas e neonicotinóides é a ingestão de alimento contaminado: a ação sistêmica desses inseticidas faz com que a substância ativa seja translocada para partes da planta, atingindo o pólen e o néctar como resíduos (Rortais et al., 2005; Blacquièrre et al., 2012). Ao coletarem esses recursos, as operárias forrageiras os transportarão para dentro das colônias e, posteriormente serão consumidos por abelhas de todas as idades, incluindo imaturos, principalmente através do alimento larval. Assim, é evidente a importância da padronização de testes que envolvam abelhas em todas as idades, para que seja possível prever os potenciais prejuízos para a colônia como um todo, bem como atingir medidas mitigadoras dos efeitos sobre abelhas.

1.1. AVALIAÇÃO DE ABELHAS ADULTAS

Fairbrother et al. (2014) enfatizam que, apesar de alguns indicadores comportamentais serem incluídos como semi qualitativos em testes de toxicidade, até o momento, o único parâmetro que efetivamente apresenta protocolo padronizado é a mortalidade. Os resultados de exposição aguda são detectáveis em períodos de até 72 horas e os de exposição crônica, detectáveis entre 96 horas até 10 dias. No segundo caso, comportamento de imobilização,

ausência de coordenação e respostas de extensão da probóscide a estímulo com sacarose são registrados. Além disso, esses testes incluem a exposição oral ou por contato (aplicação tópica no dorso da abelha), e envolvem apenas indivíduos de idade adulta (Medrzycki et al., 2013).

Em nosso estudo, nós buscamos estender o período de avaliação, sem focar na obtenção de DL50 ou CL50, mas sim, verificar as potenciais consequências adversas que as abelhas forrageiras apresentariam ao longo de seu desenvolvimento (consumo de alimento e longevidade), tendo o alimento administrado de forma contínua, até que o último indivíduo morresse.

Na simulação de doses reais de campo de tiametoxam em nossos testes, as operárias forrageiras de *Bombus terrestris audax* apresentaram redução no tempo de vida e no consumo de alimento, enquanto que, as de *Scaptotrigona bipunctata* apenas no consumo. Em contraste, forrageiras de *Apis mellifera* não apresentaram alterações em nenhum dos parâmetros avaliados em nosso estudo, no intervalo de doses reais¹.

Assim, nós assumimos cautelosamente que, via ingestão de alimento, operárias forrageiras de *B. terrestris audax* são mais sensíveis à ação de tiametoxam, seguidas por *S. bipunctata* e *A. mellifera*. Nesse sentido, nossos resultados demonstraram que o tamanho do corpo não é um fator relevante quando a exposição à neonicotinóides ocorre via ingestão de alimento. Esse parâmetro parece ser importante quando a exposição ocorre através do contato externo do corpo da abelha com o inseticida, conforme demonstrado por Valdovinos-Nuñez et al. (2009) e por Brittain e Potts et al. (2011).

Dessa forma, nossos resultados corroboram os de Hardstone e Scott (2010) que, considerando as seis classes de inseticidas, e Arena e Sgolastra (2014) que,

1. Os experimentos com *Bombus terrestris audax* e *Apis mellifera* foram conduzidos na University of Exeter, Hatherly Labs, na cidade de Exeter, Devon, Reino Unido, sob a supervisão do Dr. James Edgar Cresswell.

considerando os a classe dos neonicotinóides, demonstraram que *A. mellifera* foi a espécie menos sensível à ação dos inseticidas.

1.2. AVALIAÇÃO DE IMATUROS

O estudo de revisão de Medrzycki et al. (2013) deixa claro que, mais uma vez, a mortalidade é o único parâmetro efetivamente padronizado na literatura quanto à avaliação de imaturos. Os autores acrescentam que registros do tempo de desenvolvimento, do peso de pré-pupas e de malformação de asas podem ser considerados como informações adicionais, com referência a efeitos subletais.

Nossos resultados evidenciaram que a mortalidade não foi um parâmetro conclusivo quanto aos potenciais efeitos adversos em abelhas sem ferrão, decorrentes do consumo de tiametoxam. As consequências negativas da exposição em estágio larval foram observadas no desenvolvimento tardio dos imaturos expostos às maiores doses, bem como na formação de indivíduos menores e com assimetria de asas. Assim, enfatizamos a importância e a necessidade da padronização de avaliações de toxicidade que envolva efeitos subletais, como os demonstrados em nosso estudo de criação *in vitro*. Além disso, o único trabalho que, até o momento, considerou essas abordagens, para abelhas sem ferrão, foi desenvolvido por Tomé et al. (2012), utilizando a espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides*. Os demais utilizam como modelo *A. mellifera* (Oomen et al., 1992; Peng et al., 1992; Aupinel et al., 2007a; Aupinel et al. 2007b; Hendriksma et al., 2012; Wilkins et al., 2013; Charpentier et al., 2014).

Dessa forma, nos protocolos atualmente padronizados, existem muitas lacunas a serem preenchidas, tanto quanto às avaliações em estágio adulto quanto imaturos. Os testes padronizados até o momento são importantes para a

observação, em primeira instância, de qualquer anormalidade em decorrência da ingestão e/ ou contato de determinada substância. A detecção de problemas deve conduzir essas substâncias a testes mais consistentes. Recentemente, a European Food Safety Authority (EFSA, 2013) apresentou testes que consideram a contaminação de adultos e imaturos através do pólen ou néctar, mas estes ainda se encontram em processo de avaliação.

2. CONSIDERAÇÕES SOBRE EXPERIMENTOS QUE ENFATIZAM EFEITOS SUBLETAIS DE NEONICOTINÓIDES EM ABELHAS

Pilling et al., (2013) e Carreck e Ratnieks (no prelo) afirmam que os estudos conduzidos em condições de laboratório e em casas de vegetação tem evidenciado efeitos subletais em abelhas, através da exposição dos indivíduos a doses muito superiores às registradas em campo (Gill et al., 2012; Henry et al., 2012; Schneider et al., 2012; Whitehorn et al., 2012).

De fato, a aproximação de uma situação real de campo envolve inúmeras variáveis ambientais e a condução de experimentos que buscam fazer essa abordagem, como o nosso caso, muitas vezes são alvo de críticas. Laycock et al. (2014) advertem que os resultados provenientes desses tipos de testes devem ser interpretados cautelosamente, porém, nunca desconsiderados.

Mesmo os testes de campo como o de Pilling et al. (2013) que, durante quatro anos monitoraram colônias de *A. mellifera* em áreas de canola e milho tratados com tiametoxam, sendo cautelosos em considerar, inclusive o possível fluxo de resíduos em decorrência da rotação de culturas, apresentam algumas lacunas. Por exemplo, a exposição das colônias de *A. mellifera* consistiu da instalação das mesmas em estufas em cultivo de canola e milho em pré-floração.

Sabe-se que as flores de canola ofertam pólen e néctar para essas abelhas, porém as flores de milho não produzem néctar e não são consideradas atrativas. Sendo assim, se as abelhas estivessem totalmente livres, ou seja, numa situação real de campo, talvez elas buscassem recursos em outras fontes, que poderiam também estar contaminadas com resíduos. Além disso, as áreas consideradas como controle não deveriam conter qualquer resíduo da substância ativa que está sendo considerada.

O propósito de nossa colocação referente aos experimentos de Pilling et al. (2013) não teve como objetivo contestar a validade de seus resultados, mas sim, advertir que todo e qualquer tipo de experimento sempre apresentará lacunas. As variáveis ambientais são inúmeras e podem interferir a todo instante durante os experimentos. Sendo assim, qualquer efeito adverso proveniente de testes, sejam conduzidos em laboratório, casa de vegetação ou campo, é um sinal de alerta e deve ser considerado.

É importante considerar que o estudo de Pilling et al. (2013) monitorou colônias de *A. mellifera*, a qual, em nosso mostrou ser a espécie menos sensível à ingestão do neonicotinóide tiametoxam, em se tratando de operárias forrageiras, comparativamente à *B. terrestris audax* e *S. bipunctata*. Os protocolos padronizados utilizam como modelo de estudo *A. mellifera*, no entanto, as espécies de abelhas diferem ecologicamente e podem, dentre outros fatores, diferir quanto às rotas de exposição aos inseticidas. Hopwood et al. (2012) acrescentam que *A. mellifera* não deve ser o único modelo para ensaios toxicológicos, ressaltando a importância da coleta de dados para espécies de *Bombus* e abelhas solitárias.

3. POTENCIAIS ALTERNATIVAS PARA A MITIGAÇÃO DOS EFEITOS DE NEONICOTINÓIDES EM ABELHAS

Dentre as formas de aplicação de neonicotinóides, a pulverização foliar é considerada como aquela que oferece maiores riscos de exposição, tanto para inimigos naturais que controlam pragas (Roubos et al., 2014) quanto para abelhas (Dively & Kamel, 2012). Nesse contexto, além da exposição dos indivíduos à própria cultura-alvo, o vento pode ser um importante veículo de transporte das substâncias ativas para flores de outras culturas. Entretanto, os resíduos de pó liberados durante o plantio de sementes tratadas com neonicotinóides também pode ser conduzido pelo vento, atingindo flores que podem ser atrativas para abelhas, inclusive, metodologias estão disponíveis para avaliação desse tipo de contaminação (Medrzycki et al., 2013). Dessa forma, o tratamento de sementes, além de sua ação sistêmica que conduz resíduos ao pólen e néctar, também oferece risco de exposição através da poeira.

Roubos et al. (2014) acrescentam que os impactos negativos de inseticidas a populações de inimigos naturais que são utilizados para o controle de pragas podem ser reduzidos se forem aplicados de maneira que minimizem a exposição. Nesse caso, os mesmos autores referem às aplicações diretamente no solo como menos prejudiciais do que as outras formas de aplicações.

Além disso, Morales-Rodriguez e Peck (2009) demonstram que combinações sinérgicas de inseticidas biológicos e químicos, incluindo os neonicotinóides, podem ser alternativas promissoras para o controle de pragas. Somado a isso, Xavier et al. (2010) apresentam como alternativa a aplicação de inseticidas botânicos, os quais não ocasionaram efeitos adversos em seus testes com abelhas sem ferrão.

4. PROPOSTAS METODOLÓGICAS PARA O MONITORAMENTO DOS EFEITOS DE NEONICOTINÓIDES EM ABELHAS SEM FERRÃO

Nossos resultados nos levam a enfatizar a necessidade da inclusão de abelhas sem ferrão em estudos toxicológicos. A importância das abelhas nativas do Brasil para cultivos agrícolas vem sendo evidenciada (Heard, 1999; Slaa et al., 2000; Del Sarto et al., 2005; Slaa et al., 2006; Nunes-Silva et al., 2013) e, paralelamente, são crescentes as preocupações acerca de sua exposição a pesticidas (Valdovinos-Núñez et al., 2009; Xavier et al., 2010; Lourenço et al., 2012; Sánchez et al., 2012; Tomé et al., 2012; Ferreira et al., 2013; Jacob et al., 2013).

Dessa forma, propomos algumas importantes medidas como etapa inicial para a investigação do problema em abelhas sem ferrão. Primeiramente é importante a realização de um levantamento das culturas agrícolas existentes aos arredores das áreas onde estão as colônias, extrapolando-se os limites do raio de voo das abelhas, bem como das flores que estão dentro do raio de voo. Essas informações nos permitirá conhecer quais os plantios fazem o uso de neonicotinóides, bem como os períodos de aplicação dos inseticidas. Isso possibilitará a elaboração de medidas preventivas de contaminação direta das colônias, ao menos em primeira instância. No primeiro caso, uma vez que a substância tóxica pode ser conduzida pelo vento, a contaminação de abelhas pode ter origem em resíduos provenientes de áreas mais distantes, cuja aplicação é foliar ou em sementes.

Paralelamente, será possível a realização do monitoramento das colônias, em períodos pré e pós-aplicação dos inseticidas (considerando-se o tempo de persistência dos compostos nos substratos), através de coletas de amostras

indicadoras de contaminação: (i) abelhas forrageiras (Rancan et al., 2006; Girotti et al., 2010; Pohoreka et al., 2012; Cresswell et al., 2013; Tapparo et al., 2013; Sanchez-Bayo & Goka, 2014); (ii) pólen das corbículas (Chauzat et al., 2006); (iii) pólen e mel armazenados nas colônias (Bernal et al., 2010; Kamel, 2010; Tanner & Czerwenka, 2011; Krupke et al., 2012; Pohoreka et al., 2012; Giroud et al., 2013; Kasiotis et al., 2014; Paradis et al., 2014); (iv) alimento larval e favos de cria (Wu et al., 2011); pólen e néctar de flores contidas no raio de voo das abelhas (Dively & Kamel, 2012; Stoner & Eitzer, 2012; Kasiotis et al., 2014; Yañez et al., 2014). A partir desses materiais, testes químicos como as cromatografias líquida e gasosa nos indicarão informações qualitativas e quantitativas dos compostos.

Essa etapa inicial é essencial para que possamos conhecer o quanto de resíduos está sendo levado e armazenado dentro das colônias, e buscar entender os riscos que o ambiente está oferecendo às abelhas. Conforme descrito no capítulo 4 desta tese, a extração e detecção de compostos neonicotinóides em operárias forrageiras tornaram a espécie *Scaptotrigona* aff. *depilis* como alternativa para indicação de contaminação ambiental por pesticidas. Somado a isso, a coleta das informações aqui propostas serão fundamentais para que possamos traçar caminhos mais consistentes com intuito de proteger e conservar as abelhas desse grupo. Além disso, esse enfoque abrirá possibilidades para novas linhas de pesquisa.

REFERÊNCIAS

Arena, M., & Sgolastra, F. (2014). A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*, 1-11.

Aupinel, P., Medrzycki, P., Fortini, D., Michaud, B., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007a). A new larval *in vitro* rearing method to test effects of pesticides on honey bee brood. *Redia XC*, 87-90.

Aupinel, P., Fortini, D., Michaud, B., Marolleau, F., Tasei, J. N., & Odoux, J. F. (2007b). Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new *in vitro* standardized feeding method. *Pest management science*, 63(11), 1090-1094.

Bernal, J., Garrido-Bailon, E., Del Nozal, M. J., Gonzalez-Porto, A. V., Martin-Hernandez, R., Diego, J. C., ... & Higes, M. (2010). Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. *Journal of Economic Entomology*, 103(6), 1964-1971.

Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973-992.

Brittain, C., & Potts, S. G. (2011). The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic and Applied Ecology*, 12(4), 321-331.

Carreck, N. L., Ratnieks, & F., L. W. (no prelo). The dose makes the poison”: have “field realistic” rates of exposure of neonicotinoid insecticides to bees been overestimated in laboratory studies? *Ecology Letters*.

Charpentier, G., Vidau, C., Ferdy, J. B., Tabart, J., & Vetillard, A. (2014). Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared *in vitro*. *Pest management science*, 70(1), 140-147.

Chauzat, M. P., Faucon, J. P., Martel, A. C., Lachaize, J., Cougoule, N., & Aubert, M. (2006). A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*, 99(2), 253-262.

Cresswell, J. E., Robert, F. X. L., Florance, H., & Smirnoff, N. (2013). Clearance of ingested neonicotinoid pesticide (imidacloprid) in honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Pest management science*, 70(2), 332-337.

Del Sarto, M. C. L., Peruquetti, R. C., & Campos, L. A. O. (2005). Evaluation of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. *Journal of economic entomology*, 98(2), 260-266.

Dively, G. P., & Kamel, A. (2012). Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(18), 4449-4456.

European Food Safety Authority (EFSA) (2013). Guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal*, 11, 3295.

Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., & Fell, R. (2014). Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(4), 719-731.

Ferreira, R. A. C., Silva Zacarin, E. C. M., Malaspina, O., Bueno, O. C., Tomotake, M. E. M., & Pereira, A. M. (2013). Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. *Micron*, 46, 57-65.

Gill, R. J., Ramos-Rodriguez, O., & Raine, N. E. (2012). Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. *Nature*, 491(7422), 105-108.

Girotti, S., Maiolini, E., Ghini, S., Eremin, S., & Manes, J. (2010). Quantification of imidacloprid in honeybees: development of a chemiluminescent ELISA. *Analytical Letters*, 43(3), 466-475.

Giroud, B., Vauchez, A., Vulliet, E., Wiest, L., & Buleté, A. (2013). Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1316, 53-61.

Hardstone, M. C., & Scott, J. G. (2010). Is *Apis mellifera* more sensitive to insecticides than other insects?. *Pest management science*, 66(11), 1171-1180.

Heard, T. A. (1999). The role of stingless bees in crop pollination. *Annual Review of Entomology*, 44(1), 183-206.

Hendriksma, H. P., Härtel, S., & Steffan-Dewenter, I. (2011). Honey bee risk assessment: new approaches for *in vitro* larvae rearing and data analyses. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(5), 509-517.

Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J. F., Aupinel, P., ... & Decourtye, A. (2012). A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science*, 336(6079), 348-350.

Hopwood, J., Vaughan, M., Shepherd, M., Biddinger, D., Mader, E., Black, S. H., & Mazzacano, C. (2012). Are Neonicotinoids Killing Bees? A Review of Research into the Effects of Neonicotinoid Insecticides on Bees, with Recommendations for Action. 40pp. Portland, OR: The Xerces Society for Invertebrate Conservation. *The Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland, OR.*

Jacob, C. R. O., Soares, H. M., Carvalho, S. M., Nocelli, R. C. F., & Malaspina, O. (2013). Acute toxicity of fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 90(1), 69-72.

Kamel, A. (2010). Refined Methodology for the Determination of Neonicotinoid Pesticides and Their Metabolites in Honey Bees and Bee Products by Liquid Chromatography– Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)[†]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 5926-5931.

Kasiotis, K. M., Anagnostopoulos, C., Anastasiadou, P., & Machera, K. (2014). Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of The Total Environment*, 485, 633-642.

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

Laycock, I., Cotterell, K. C., O'Shea-Wheller, T. A., & Cresswell, J. E. (2014). Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees. *Ecotoxicology and environmental safety*, 100, 153-158.

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

Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L., Chauzat, M. P., Classen, C., ... & Vidau, C. (2013). Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*.

Morales-Rodriguez, A., & Peck, D. C. (2009). Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. *Biological Control*, 51(1), 169-180.

Rancan, M., Rossi, S., & Sabatini, A. G. (2006). Determination of thiamethoxam residues in honeybees by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor. *Journal of Chromatography a*, 1123(1), 60-65.

Nunes-Silva, P., Hrnčir, M., da Silva, C. I., Roldão, Y. S., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2013). Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. *Apidologie*, 44(5), 537-546.

Oomen, P. A., Ruijter, A. D., & Steen, J. (1992). Method for honeybee brood feeding tests with insect growth-regulating insecticides. *EPPO Bulletin*, 22(4), 613-616.

Paradis, D., Bérail, G., Bonmatin, J. M., & Belzunces, L. P. (2014). Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(2), 621-633.

Peng, Y. S. C., Mussen, E., Fong, A., Montague, M. A., & Tyler, T. (1992). Effects of chlortetracycline on honey bee worker larvae reared in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*, 60(2), 127-133.

Pilling, E., Campbell, P., Coulson, M., Ruddle, N., & Tornier, I. (2013). A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. *PloS one*, 8(10), e77193.

Pohorecka, K., Skubida, P., Miszczak, A., Semkiw, P., Sikorski, P., Zagibajło, K., ... & Bober, A. (2012). Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant materials from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *Journal of Apicultural Science*, 56(2), 115-134.

Rortais, A., Arnold, G., Halm, M. P., & Touffet-Briens, F. (2005). Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, 36(1), 71-83.

Roubos, C. R., Rodriguez-Saona, C., & Isaacs, R. (2014). Mitigating the effects of insecticides on arthropod biological control at field and landscape scales. *Biological Control*.

Sánchez, D., Solórzano, E. D. J., Liedo, P., & Vandame, R. (2012). Effect of the Natural Pesticide Spinosad (GF-120 Formulation) on the Foraging Behavior of *Plebeia moureana* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of economic entomology*, 105(4), 1234-1237.

Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide Residues and Bees—A Risk Assessment. *PloS one*, 9(4), e94482.

Schneider, C. W., Tautz, J., Grünewald, B., & Fuchs, S. (2012). RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. *PLoS One*, 7(1), e30023.

Slaa, E. J., Sánchez, L. A., Sandí, M., & Salazar, W. (2000). A scientific note on the use of stingless bees for commercial pollination in enclosures. *Apidologie*, 31(1), 141-142.

Slaa, E. J., Chaves, L. A. S., Malagodi-Braga, K. S., & Hofstede, F. E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, 37(2), 293-315.

Stoner, K. A., & Eitzer, B. D. (2012). Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*). *PLoS One*, 7(6), e39114.

Tanner, G., & Czerwenka, C. (2011). LC-MS/MS analysis of neonicotinoid insecticides in honey: Methodology and residue findings in Austrian honeys. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(23), 12271-12277.

Tapparo, A., Giorio, C., Soldà, L., Bogialli, S., Marton, D., Marzaro, M., & Girolami, V. (2013). UHPLC-DAD method for the determination of neonicotinoid insecticides in single bees and its relevance in honeybee colony loss investigations. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(2-3), 1007-1014.

Tomé, H. V. V., Martins, G. F., Lima, M. A. P., Campos, L. A. O., & Guedes, R. N. C. (2012). Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PloS one*, 7(6), e38406.

Valdovinos-Núñez, G. R., Quezada-Euán, J. J. G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H., Carmona, A., & Sánchez, E. R. (2009). Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Journal of economic entomology*, 102(5), 1737-1742.

Whitehorn, P. R., O'Connor, S., Wackers, F. L., & Goulson, D. (2012). Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336(6079), 351-352.

Wilkins, S., Jarratt, N., Harkin, S., Thompson, H., & Coulson, M. (2013). Effects of solvent on the toxicity of dimethoate in a honey bee *in vitro* larval study. *Pest management science*, 69(4), 462-463.

Wu, J. Y., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, 6(2), e14720.

Yáñez, K. P., Martín, M. T., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2014). Trace Analysis of Seven Neonicotinoid Insecticides in Bee Pollen by Solid–Liquid Extraction and Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 7(2), 490-499.

Xavier, V. M., Message, Dejair, Picanco, M. C., Bacci, L., Silva, G. A., & Benevenuto, J. D. S. (2010). Impact of Botanical Insecticides on Indigenous Stingless Bees (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, 56(3), 713-725.