



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO



---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**DANIELA RAFAEL SIMÕES DE OLIVEIRA**

**Determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>)  
do inseticida imidacloprido para larvas de  
abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 e  
seus efeitos sobre o desenvolvimento**



Rio Claro - SP  
2022

DANIELA RAFAEL SIMÕES DE OLIVEIRA

**Determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) do inseticida imidacloprido para larvas de abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 e seus efeitos sobre o desenvolvimento**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientadora: Adna Suelen Dorigo

Rio Claro - SP  
2022

O48d

Oliveira, Daniela Rafael Simões de

Determinação da concentração letal média (CL50) do inseticida imidacloprido para larvas de abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 e seus efeitos sobre o desenvolvimento / Daniela Rafael Simões de Oliveira. -- Rio Claro, 2022

21 f.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientadora: Adna Suelen Dorigo

1. Produtos químicos agrícolas. 2. Abelhas. 3. Toxicidade. I. Título.

DANIELA RAFAEL SIMÕES DE OLIVEIRA

**Determinação da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) do inseticida imidacloprido para larvas de abelhas *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 e seus efeitos sobre o desenvolvimento**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Campus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Adna Suelen Dorigo (coorientadora)

Dra. Annelise de Souza Rosa Fontana

Dra. Tatiane Caroline Grella

Aprovado em: 18 de Novembro de 2022



Assinatura do discente



Assinatura do(a) orientador(a)



Assinatura do(a) coorientador(a)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 OBJETIVOS.....	8
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 Procedimentos anteriores aos ensaios in vitro.....	8
3.2 Determinação da CL <sub>50</sub> .....	9
3.3 Análises morfométricas.....	9
3.4 Análise enzimática.....	10
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4.1 CL <sub>50</sub> imidacloprido.....	10
4.2 Enzimática .....	11
4.3 Morfologia .....	14
5 CONCLUSÃO .....	15
6 REFERÊNCIAS .....	16

**RESUMO:**

A importância das abelhas se dá pelo fato de serem grandes responsáveis pela polinização mundial. Entretanto, diversos fatores como o uso exacerbado de agrotóxicos está causando danos a espécies de abelhas, levando suas populações a um constante declínio. Dentre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, encontram-se os neonicotinóides, como o imidacloprido. Apesar de existirem estudos realizados com *A. mellifera* que avaliam os danos que agrotóxicos causam à polinizadores, fazem-se estudos que tenham como modelo abelhas de espécies nativas, de modo a avaliar o dano causado às espécies brasileiras. Além disso, o estágio larval é uma importante fase a ser analisada, visto que permite a avaliação de possíveis efeitos subletais desde o início do desenvolvimento. Análises enzimáticas de órgãos como cérebros e intestinos, permitem observar esses efeitos do imidacloprido ao nível celular, detectando possíveis alterações nas enzimas Acetilcolinesterase, Carboxilesterase e Fosfatase Alcalina. No presente estudo foi determinada a  $CL_{50}$  do imidacloprido para larvas de *S. postica* no valor de 75, 6 ng i.a./L. Os resultados obtidos mostraram um aumento na atividade enzimática da AChE nas larvas de *S. postica* expostas à  $CL_{50}$  e à Dose de Campo (DC), aumento na atividade da enzima CaE no grupo exposto à  $CL_{50}$  e não houve alteração na atividade da PAL nos grupos expostos ao imidacloprido em relação ao grupo controle. As análises morfométricas demonstram que a média da distância intertegular das recém emergidas expostas à concentrações de 75 ng i.a./L são significativamente menores do que as medidas encontradas no grupo controle. Enquanto a média da largura da cabeça das abelhas expostas às concentrações de 50 e 75 ng i.a./L foi significativamente menor do que a do grupo controle. Os dados obtidos serão úteis ao preenchimento de lacunas de conhecimento sobre os efeitos de agrotóxicos em abelhas sem ferrão, contribuindo, de forma significativa, para as questões de avaliação ambiental e regulamentação do uso de agrotóxicos.

**Palavras-chave:** agrotóxico, abelhas sem ferrão, toxicidade, desenvolvimento larval

**ABSTRACT:**

The importance of bees lies in the fact that they are majorly responsible for global pollination. However, many factors as the excessive use of pesticides is causing damage to bee species, leading their populations to a constant decay. The neonicotinoids, such as imidacloprid, are among the most utilized pesticides in Brazil. Even though there are studies performed in *A. mellifera* that evaluate the damage that pesticides cause to pollinators, it is necessary to utilize native bee species as study models in order to evaluate the damage caused to Brazilian species. Furthermore, the larval stage is important to be analyzed, since it allows the evaluation of possible sublethal effects since the beginning of the larval development. Enzymatic analysis of organs such as brains and intestines, allow to observe these imidacloprid effects at a cellular level, detecting possible alterations in the Acetylcholinesterase, Carboxylesterase and Alkaline Phosphatase enzymes. At the present study, the LC50 of imidacloprid for *S. postica* larvae was determined at the value of 75, 6 ng i.a./L. The obtained results showed an increase in enzymatic activity of AChE in the *S. postica* larvae exposed to the LC50 and the field dose, increase in the CaE activity for the group exposed to the LC50 and there was no alteration in the PAL activity in the groups exposed to imidacloprid, regarding the control group. The morphometric analysis show that the average intertegular distance of the newly emerged bees exposed to the concentration of 75 ng i.a./L are significantly smaller than the control group. While the average head width of bees exposed to concentrations of 50 e 75 ng i.a./L was significantly smaller than the control group. The obtained data will be useful for filling knowledge gaps about the effects of pesticides on stingless bees, contributing significantly with environmental evaluation issues and regulation of pesticides.

**Keywords:** pesticide, stingless bees, toxicity, larval development

## 1. INTRODUÇÃO

A polinização é de extrema importância para a manutenção da biodiversidade vegetal e conseqüentemente animal do planeta, visto que a reprodução sexuada das plantas ocorre através da polinização, acarretando benefícios como maior variabilidade genética e maior capacidade de sobrevivência nas plantas oriundas de reprodução sexuadas (KERR et al., 2001; KEVAN, 2002; NOCELLI et al., 2012).

O recente “Relatório Temático de Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos” evidencia que, além da reprodução e manutenção da diversidade de espécies de plantas nativas, os polinizadores também são de suma importância para prover alimentos para consumo humano. Cerca de 75% dos cultivos agrícolas que alimentam o mundo dependem da ação desses agentes (BPBES, 2019).

As abelhas representam o grupo mais importante e eficiente de agentes polinizadores, pois se comparadas com outros, realizam a polinização de mais espécies de plantas do que qualquer outro grupo (SPADOTTO et al., 2004). Na verdade, em termos evolutivos, as abelhas e plantas florísticas diversificaram-se juntas ao longo dos últimos 80 milhões de anos, portanto, as abelhas desenvolveram partes bucais, corbícula, cerdas no corpo e outros apêndices com adaptações para transportar pólen e néctar (IMPERATRIZ-FONSECA, 2006). Em contrapartida, as flores desenvolveram atrativos para as abelhas, como cores nas pétalas e odores, além de recompensas como o pólen das flores, rico em proteínas e o néctar, fonte de açúcares (IMPERATRIZ-FONSECA, 2006). Sabe-se que mais de 20 mil espécies de abelhas são conhecidas, no entanto, acredita-se que existam 40 mil espécies ainda não descobertas. Dentre as espécies de abelhas, apenas 2% são sociais e produzem mel (MICHENER, 2013). O Brasil, por possuir clima tropical, território extenso e vasta riqueza em sua vegetação nativa, além de ampla biodiversidade em todos os biomas, em geral, caracteriza como um território propício à atividade apícola (SOUZA et al, 2009).

O grande potencial apícola brasileiro se evidencia pelo número de espécies de abelhas nativas, cerca de 2.500 espécies de abelhas já classificadas e distribuídas em cinco famílias (SILVA et al, 2014). O país abriga a maior diversidade de abelhas sem ferrão, correspondendo a mais de 350 espécies descritas (MOURE, 2019).

As abelhas sem ferrão são responsáveis por polinizar de 40 – 90% das plantas nativas no Brasil dependendo do ecossistema considerado, e características

como o hábito, comportamento e morfologia da espécie justificam sua eficiência em alguns casos (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; WITTER et al., 2014).

A morfologia das abelhas é de extrema importância para sua função de polinização, o comprimento e largura das asas está intimamente relacionado com capacidade de voo dos indivíduos, enquanto o comprimento da probóscide afeta diretamente a entrada de néctar na colmeia (SOUZA et al, 2009). As estruturas morfológicas das abelhas são muito utilizadas na taxonomia, pois divergem entre espécies, estabelecendo uma correlação entre a morfologia da abelha e a estrutura da planta a ser polinizada por ela. (RUTTNER, 1988)

Os meliponíneos, assim chamadas todas as abelhas que pertencem à tribo Meliponini, chegam a polinizar em áreas agrícolas, cerca de 66% das 1.500 espécies cultivadas no mundo (KREMEN; WILLIAMS; THORP, 2002). Além disso, em ecossistemas terrestres podem ser utilizados como bioindicadores, principalmente em estudos ecotoxicológicos (MALASPINA, SILVA-ZACARIN, 2006).

O uso de agrotóxicos tornou-se uma ferramenta recorrente, com a finalidade de aumentar a produção agrícola, visando priorizar a quantidade e a qualidade dessa produção. Porém, o uso excessivo e indiscriminado desses produtos causa impactos ambientais deixando resíduos no solo, no ar, na água e até mesmo nas plantas (Blacquièrre et al., 2012). Com base nessas informações, é válido evidenciar que a aplicação destes produtos exibe um grande espectro de ação, ou seja, além de atingir as pragas agrícolas também conseguem atingir insetos benéficos, como as abelhas (SPADOTTO et al., 2004).

Dentre os agrotóxicos utilizados no campo, estão os inseticidas neonicotinóides, como o imidacloprido, que é um composto neurotóxico com característica sistêmica. Esse ingrediente é comumente aplicado em culturas cítricas, cujas flores são atrativas a abelhas, incluindo o gênero de abelha sem ferrão *Scaptotrigona* (Faria et al., 2012). O imidacloprido atua competindo com a acetilcolina pelos receptores nicotínicos do sistema nervoso central e não é degradado pela acetilcolinesterase, levando a transmissão contínua de impulsos nervosos, provocando hiperexcitação e consequente morte do inseto (MAIENFISCH et al, 2001; TOMIZAWA; CASIDA, 2003). Segundo Rortais et al. (2005) a contaminação das abelhas pode ocorrer através do contato direto com os inseticidas durante a pulverização no período de florada, ou quando coletam pólen, néctar e outros recursos florais contaminados com inseticidas e levando posteriormente, a

contaminação das larvas que consomem o alimento larval que será elaborado com os ingredientes estocados no interior da colônia (Villa et al., 2000).

A exposição das abelhas à inseticidas como o imidacloprido, pode ser evidenciada por testes toxicológicos que indicam a atividade de enzimas de detoxificação (BADIOU-BENETEAU et al., 2012; CARVALHO et al., 2013).

Ao analisar os resultados dos testes toxicológicos, é possível quantificar a perturbação causada pela exposição ao contaminante, ao nível celular, devido às enzimas que atuam como biomarcadores de exposição, como a Acetilcolinesterase, a Glutathione S-Transferase e a Carboxilesterase (CAJARAVILLE et al., 2000).

A enzima Acetilcolinesterase (AChE) tem papel na transmissão de impulsos nervosos através da hidrólise de acetilcolina. Porém a função da Acetilcolinesterase pode ser comprometida na presença do imidacloprido, visto que este princípio ativo compete pelo sítio de ligação de acetilcolina. (BADIOU et al., 2008).

A enzima Fosfatase Alcalina (PAL) se trata de uma enzima digestiva que participa em processos de adsorção e transporte através da hidrólise de grupos fosfatos, apresentando, portanto, potencial como enzima biomarcadora para avaliação de contaminação em abelhas (MOSS, 1992).

Já a enzima Carboxilesterase (CaE) atua na detoxificação celular, facilitando a eliminação de substâncias tóxicas pelo organismo, e evitando assim prejuízos causados pela eventual presença de inseticidas e outros compostos químicos (STONE; JEPSON; LASKOWSKI, 2002; BADIOU-BÉNÉTEAU et al. 2012).

Atualmente o Brasil está passando por um processo de reavaliação de neonicotinóides, porém há um questionamento referente ao uso de *A. mellifera* como organismo modelo, substituindo espécies nativas em avaliações de risco. Muitos países adotam a espécie *A. mellifera* como único modelo para testes de risco de agrotóxicos, porém há dúvidas sobre a capacidade dessa espécie de contemplar os reais riscos apresentados para outras espécies, como as abelhas sem ferrão da tribo Meliponini, que possuem uma grande diversidade morfológica e de hábitos. Além da diversidade presente no grupo dos meliponíneos, nota-se características muito diferentes em *A. mellifera* e meliponíneos, seja em sua alimentação, construção de ninhos ou morfologia, o que deixa espaço para questionar se os efeitos da exposição a pesticidas é o mesmo para *A. mellifera* e Meliponini. Assim, faz-se de extrema importância a realização de avaliações de risco de pesticidas utilizando modelos de abelhas nativas da tribo Meliponini (CHAM, 2019).

O presente estudo visa determinar a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) para larvas da espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica* submetidas ao inseticida imidacloprido, e realizar análises morfométricas comparativas das abelhas recém emergidas provenientes da exposição a todas as concentrações do agrotóxico, de modo a avaliar os possíveis efeitos do inseticida sobre a morfologia externa e simetria das abelhas. Além de analisar a atividade enzimática nos órgãos das abelhas a fim de observar possíveis alterações causadas pelo uso de imidacloprido

## **2. OBJETIVOS**

- Determinar a concentração letal média (CL<sub>50</sub>) para larvas da espécie *Scaptotrigona postica* submetidas ao inseticida imidacloprido
- Avaliar os possíveis efeitos da exposição nas abelhas recém emergidas utilizando análises morfométricas.
- Analisar a atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE), Fosfatase Alcalina (PAL) e Carboxilesterase (CaE) nas larvas de abelhas expostas, a fim de observar possíveis alterações.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Procedimentos anteriores aos ensaios *in vitro***

As larvas de *S. postica* utilizadas para realizar o presente trabalho foram coletadas de três colônias diferentes localizadas no meliponário do Departamento de Biologia – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus Rio Claro. As colônias foram monitoradas constantemente para garantir que fossem saudáveis e que estivessem nas condições sanitárias desejadas.

### 3.2. Determinação da CL<sub>50</sub>

Foi utilizado o método de criação larval descrito por Dorigo et al (2019) com modificações necessárias para a espécie em questão. Os favos das colônias foram monitorados para a localização de células recém-operculadas. As larvas de operárias de *S. postica* foram transferidas para placas de acrílico com tamanho semelhante às células reais naturais da espécie estudada, com o auxílio de uma agulha apícola e foram mantidas em estufas BOD.

As larvas foram criadas em diferentes condições de umidade relativa ao longo do seu desenvolvimento sendo eles 100% UR nos primeiros três dias; 85% UR nos próximos cinco dias de larva; e 75% UR no restante do desenvolvimento. Para controlar a umidade relativa foram utilizadas soluções saturadas de NaCl para manter 75% de UR, KCl para manter 85% de UR e de água destilada para manter 100% de UR. As placas de acrílico foram mantidas sem tampa e dentro de placas de Petri (150x30mm) com a solução salina ou aquosa. A temperatura da estufa BOD foi mantida em 28°C. O alimento para as larvas foi coletado, com auxílio de pipetas automáticas, da própria colônia, proveniente de favos de cria cujas células foram recém-operculadas e nas quais os ovos ainda não tinham eclodido.

Cada célula de cria de operária recebeu, em média, 25µL de alimento (DORIGO et al., 2018). Foram testadas as seguintes concentrações de imidacloprido por ng i.a./L : 0,0 (controle); 12,5; 25; 50; 75; 100.

### 3.3. Análises morfométricas

Para a análise morfométrica foram medidas a distância intertegular e largura da cabeça das abelhas emergidas, a fim de comparar as dimensões de abelhas do grupo controle com o grupo que recebeu alimento larval contaminado com imidacloprido. As medições foram realizadas através de imagens obtidas por estereoscópico com câmera acoplada (Leica M 205 C) e pelo software LAS V4.8 utilizando o módulo de medidas do próprio software.

### 3.4. Análise enzimática

Uma vez determinada a concentração letal média, foram coletadas 3 larvas de cada grupo em triplicata, incluindo controle. Os indivíduos coletados foram macerados utilizando potter com tampão fosfato 40 mM pH 7,4 e solução com 10 mM de NaCl e 1% Triton X-100, sendo posteriormente centrifugados a 13.000 xg por 20 minutos e o sobrenadante recuperado para a análise enzimática.

A leitora de placas Molecular Devices (VersaMax) foi utilizada para analisar as amostras coletadas à 25° com volume de reação de 200 µL. Todas as leituras foram realizadas em triplicata e os resultados estão em micro-mol de substrato hidrolisado por minuto e por miligramas de proteína. A albumina de soro bovina foi utilizada como padrão para a determinação de proteína, seguindo o método de Bradford (1976)

Os substratos p-nitrophenyl acetate foram utilizados para determinar a atividade da enzima Carboxilesterase, utilizando a metodologia de Badiou-Bénéteau e colaboradores (2012). Primeiramente inibindo a acetilcolinesterase, a 25°C durante 20 minutos, adicionando o extrato das larvas, 100nM de tampão fosfato Ph 7,0 ; 10<sup>-5</sup> M DE 1,5-bis (4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-one-dibromide e água destilada. Seguido do período de inibição, 0,4nM de um dos substratos será adicionado, iniciando a reação por três minutos e paralisando-a com a adição de 1,5% de sodium dodecyl sulfate + 0,4 mg/mL de Fast Garnet GBC. Finalmente, as leituras serão realizadas a 410nm.

A avaliação da atividade da Fosfatase Alcalina foi baseada no trabalho de Bessey et al. (1946) e Bounias et al. (1996). A leitura foi realizada a 410nm, contendo 20 µM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de pNPP (nitrophenyl phosphate) como substrato e 100 mM Tris-HCl, pH 8,5.

O método utilizado na análise da atividade da acetilcolinesterase foi baseado em Ellman e colaboradores (1961). Utilizando 100 mM tampão fosfato pH 7,0; 0,3 mM de iodeto de acetiltiocolina; 1,5 mM de ácido 5,5'ditiobis (2-nitrobenzóico) e o extrato obtido a partir do macerado das larvas de abelhas, com leituras a 412 nm.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. CL<sub>50</sub> imidacloprido

Ao final do período de alimentação das larvas, os dados resposta para o cálculo da  $CL_{50}$  foram obtidos, e então analisados com modelos lineares generalizados do tipo quase-binomial. Na análise foram testadas as funções de ligação logit, probit, log, log complementar e cauchit.

O modelo logístico quase-binomial com função de ligação probit foi o que melhor se ajustou aos dados de mortalidade e o ajuste do modelo foi confirmado com o uso de um envelope simulado meio normal por meio do pacote hnp do programa R.

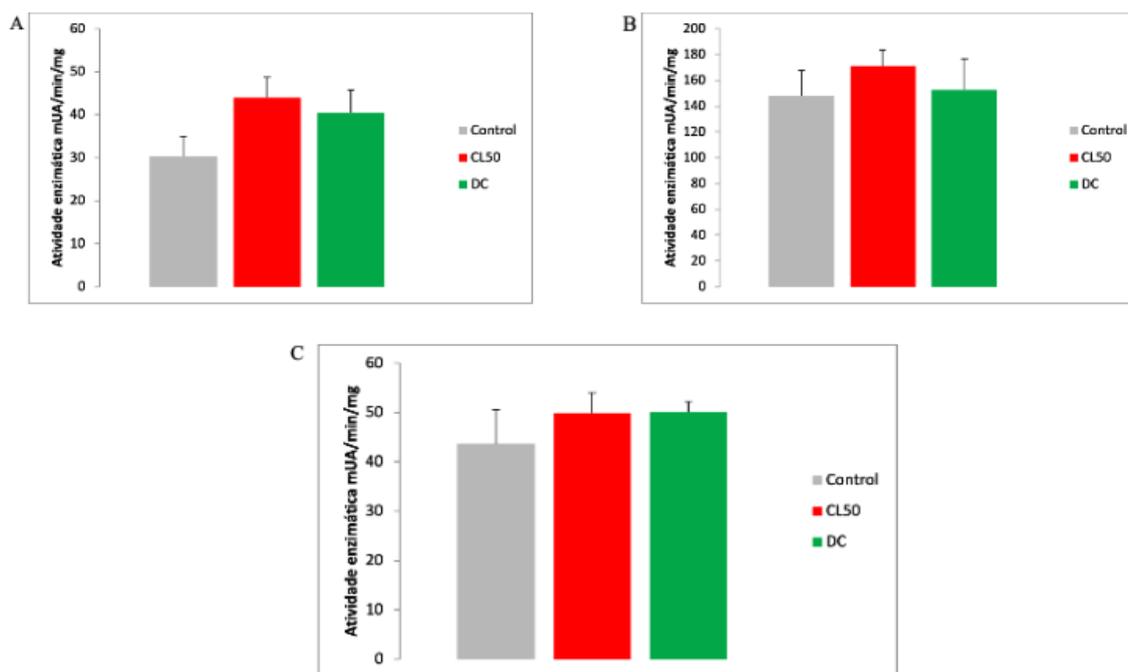
Com essa análise foi possível determinar que a  $CL_{50}$  do inseticida imidacloprido para larvas de *Scaptotrigona postica* é de 75,6 nanogramas por microlitro de alimento, com intervalo de confiança de 62,6 à 88,6. O grupo controle do experimento apresentou diferença de mortalidade significativa em comparação aos grupos expostos com inseticida, demonstrando que a ingestão de alimento contaminado com o neonicotinóide imidacloprido aumenta significativamente a taxa de mortalidade das larvas da abelha sem ferrão *S.postica* em desenvolvimento.

Comparando os dados obtidos nessa pesquisa com dados de  $CL_{50}$  de imidacloprido para larvas de *Apis mellifera* encontrados por Dai et al.(2017), observa-se que a  $CL_{50}$  de imidacloprido para larvas de *A. mellifera* é quase o dobro da  $CL_{50}$  do mesmo agrotóxico para larvas de *S. postica*, indicando que as larvas de *S. postica* são mais sensíveis que as larvas de *A.mellifera* para o imidacloprido. Os resultados do presente estudo corroboram com trabalhos anteriores de Tomé et al. (2015) and Barbosa et al. (2015) que evidenciam a importância de incluir espécies de abelhas sem ferrão em avaliações de risco para pesticidas, uma vez que há uma preocupação com a relação entre o declínio de populações de abelhas e o aumento no uso de neonicotinóides (GODFRAY et al. 2014).

#### **4.2. Enzimática**

Os dados obtidos com os testes de enzimática mostram que a enzima AChE apresentou diferença estatística significativa entre o grupo controle e os grupos submetidos ao imidacloprido, enquanto a enzima CaE apresentou diferença significativa do controle somente no grupo  $CL_{50}$  e a enzima PAL não apresentou

diferença significativa entre o controle e os grupos tratados com imidacloprido (Figs 1A, 1B e 1C).



**Figura 1. Efeitos do imidacloprido nos biomarcadores AChE (A), CaE (B) e PAL (C). As barras representam os níveis de atividade enzimática observados nas larvas dos grupos: controle, dose letal e concentração letal média.**

Os resultados mostram que a atividade da enzima AChE aumentou significativamente nos grupos expostos ao compará-los com o grupo controle. Diferindo do que foi apresentado no experimento de Badiou Bénéteau et al. (2012), no qual não ocorreu alteração da atividade da AChE em abelhas da espécie *A.mellifera* expostas cronicamente ao inseticida tiametoxam, pertencente ao grupo de neonicotinóides, assim como o imidacloprido. Gauthier et al. (2018), teve resultados semelhantes aos de Badiou Bénéteau et al. (2012) em seu estudo utilizando tiametoxam e imidacloprido. Porém, os resultados do presente estudo se mostraram semelhantes aos encontrados por Decio (2019), que apontaram um aumento significativo na atividade da AChE em indivíduos da espécie *A.mellifera* expostos ao neonicotinóide tiametoxam.

A AChE é uma enzima que tem relação direta com os neonicotinóides, visto que se trata de uma enzima responsável pela rápida hidrólise de acetilcolina nas

sinapses, permitindo um controle acurado da modulação dos neurônios transmissores (BADIOU ET AL 2008). A explicação para o aumento observado na atividade da AChE é que os neonicotinóides como o imidacloprido, simulam a ação da acetilcolina, se ligando aos receptores da enzima na membrana de células pós sinápticas, impedindo a ação da AChE pelo não reconhecimento do inseticida. Na tentativa de degradar a ligação com o receptor e restaurar o repouso, a atividade enzimática aumenta. O neonicotinóide, ao atingir seu órgão alvo, provoca hiperatividade nervosa e podendo levar ao colapso do sistema nervoso central (Ishaaya et al 2004).

Para a enzima CaE, apesar de não ocorrer uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e as larvas expostas à dose de campo, observa-se um aumento na atividade da CaE nas abelhas expostas à  $CL_{50}$  do imidacloprido. Os resultados obtidos no presente estudo contrastam com dados encontrados por Li et al.(2017), em sua pesquisa realizada com indivíduos adultos de *A. mellifera*, que ao serem expostas por 48h ao imidacloprido, apresentaram diminuição na atividade da CaE.

A CaE é uma enzima de fase I que participa no processo de desintoxicação do organismo, reagindo com compostos não polares por hidrólise. Os metabólitos originados a partir dessa reação são excretados ou então transformados por enzimas de fase II (Eaton and Bammler 1999). O aumento observado na atividade dessa enzima nas abelhas submetidas à  $CL_{50}$  de imidacloprido, pode indicar uma resposta do organismo à presença das toxinas do inseticida. Enquanto a Dose de Campo não apresentou diferença significativa do grupo controle provavelmente por ser uma dose mais baixa que a  $CL_{50}$ , não requisitando do organismo uma necessidade de desintoxicação tão grande.

Já a enzima PAL não apresentou efeito significativo tanto nas larvas expostas à  $CL_{50}$  quanto às larvas expostas à DC de imidacloprido. Em comparação com outros estudos utilizando neonicotinóides e abelhas da espécie *A. mellifera*, os resultados obtidos no presente experimento condizem com os resultados encontrados por Decio (2019), nos quais o inseticida neonicotinóide tiametoxam não apresentou efeito significativo na atividade enzimática da PAL. Por outro lado, diferem do estudo de Badiou-Bénéteau et al (2012), que apontou um aumento na atividade da PAL em adultos de *A.mellifera* expostos ao neonicotinóide tiametoxam.

A enzima PAL participa de processos digestivos através da hidrólise, da sinalização celular e também pelo transporte de metabólitos, sendo responsável por manter a homeostase do intestino médio das abelhas (Moss 1992; Lalles 2010). Portanto, por se tratar de um necrofílico e não ter o intestino como órgão alvo, o imidacloprido nas concentrações estudadas não causou efeito significativo na atividade da PAL da mesma forma que causou aumento nas outras enzimas que podem ser encontradas na cabeça das abelhas.

### 4.3. Morfologia

Os resultados obtidos com a análise da distância intertegular das abelhas estudadas, demonstra uma diferença significativa entre o grupo controle e as larvas tratadas com a concentração de 75 ng i.a./L de imidacloprido. Enquanto a largura da cabeça, se mostrou significativamente menor nos grupos tratados com as concentrações de 50 e 75 ng i.a./L de imidacloprido, quando comparadas ao grupo controle. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com os dados apresentados por Rosa (2014), que indicam uma diminuição, tanto da largura da cabeça quanto da distância intertegular de operárias de *Scaptotrigona depilis* expostas a alimento larval contaminado com concentrações mais altas de tiametoxam (neonicotinóide), quando comparadas ao grupo controle.

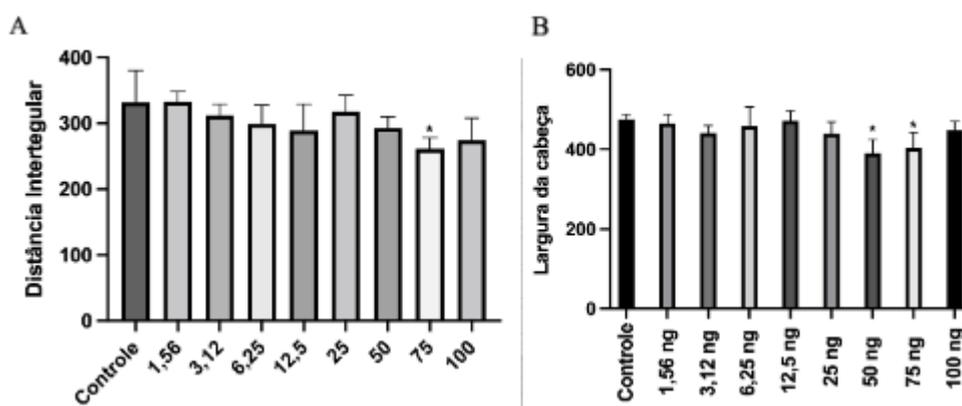


Figura 2. Medidas morfométricas (média em milímetros) da distância intertegular (A) e da largura da cabeça (B) de abelhas recém emergidas da espécie *Scaptotrigona postica* do grupo controle e tratadas com dietas de diferentes concentrações de imidacloprido durante seu desenvolvimento larval.

Com base nos resultados, é possível observar a ocorrência de efeitos subletais do neonicotinóide imidacloprido sobre a morfometria de operárias recém

emergidas de *Scaptotrigona postica*. Durante o presente trabalho, não foi estudada a longevidade das abelhas emergidas, porém, partindo das inferências de autores como Wu et al. (2011), Decourtye e Devillers (2010) e Rosa (2014), pode-se imaginar que as operárias que apresentam menor largura da cabeça e menor distância intertegular podem sofrer prejuízos durante as atividades de forrageio, processamento e armazenamento de alimento, cuidado com as crias e demais atividades praticadas para a manutenção da colônia. O que a longo prazo, poderia significar uma ameaça à sobrevivência da colônia.

## 5. CONCLUSÃO

O inseticida imidacloprido tem efeito sobre a taxa de mortalidade de larvas de *S. postica* em desenvolvimento. Sendo a concentração de 75,6 ng i.a./L de imidacloprido no alimento larval suficiente para matar 50% da população de abelhas testada (CL<sub>50</sub>). O valor por larva é de 1890 ng de i.a./larva.

Quanto aos efeitos subletais que o imidacloprido causou nas larvas de *S. postica*, foi observado um aumento significativo na atividade da enzima AChE nos grupos expostos à CL<sub>50</sub> e DC com relação ao grupo controle. A enzima CaE também teve sua atividade aumentada no grupo exposto à CL<sub>50</sub> do imidacloprido para larvas de *S. postica*, porém a DC do inseticida não teve alteração significativa se comparada ao grupo controle. E a enzima PAL não apresentou alteração estatisticamente significativa em nenhum grupo exposto. Os resultados apontam que se deve ter uma atenção ao utilizar neonicotinóides devido aos efeitos subletais nocivos que quantidades elevadas desses inseticidas podem causar nas larvas em desenvolvimento, principalmente nos órgãos alvo. A dose de campo, apesar de não ter apresentado influência significativa na atividade das enzimas CaE e PAL, causou um aumento na atividade enzimática da AChE, enzima fundamental para o controle adequado das funções neurais das abelhas.

Outro efeito subletal observado foi uma diminuição significativa na distância intertegular das operárias expostas à concentração de 75 ng i.a./L de imidacloprido, quando comparadas ao grupo controle. Enquanto a média da largura da cabeça das abelhas expostas às concentrações de 50 e 75 ng i.a./L foi significativamente menor do que a do grupo controle. Trazendo a importância de se considerar esses efeitos sobre o desenvolvimento de larvas de abelhas sem ferrão expostas à neonicotinóides como o imidacloprido, na avaliação de risco de inseticidas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADIOU-BENETEAU, A.; CARVALHO, S.M.; BRUNET, J.L.; CARVALHO, G.A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.82, p.22-31, 2012.

BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L.P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase--a biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.69, p.246-53, 2008

BARBOSA, W.F., SMAGGHE, G., GUEDES, R.N.C. (2015) Pesticides and reduced-risk insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives. *Pest Manag. Sci.* 71(8), 1049–1053

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.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248, 1976.

BESSEY OA, LOWRY OH, BROCK MJ (1946) A method for the rapid determination of alkaline phosphatases with five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem.* 164: 321-329

BOUNIAS M, KRUK I, NECTOUX M, POPESKOVIC D. (1996) Toxicology of cupric salts on honeybees. V. Gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatase. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35:67-76

CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 201–212.

CARVALHO, S.M.; BELZUNCES, L.P.; CARVALHO, G.A.; BRUNET, J.L.; BADIOU-BENETEAU, A. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. *Environmental toxicology and chemistry*, v.32, p.2117-2124, 2013.

CHAM, KARINA O. et al. Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. *Environmental Entomology*, v. 48, n. 1, p. 36-48, 2019.

DECIO, P. Estresse celular e atividade de enzimas biomarcadoras em abelhas africanizadas *Apis mellifera* LINEU, 1758 (Hymenoptera, Apidae) expostas ao tiametoxam / Pâmela Decio. -- Rio Claro, 2019.

DECOURTYE A, DEVILLERSs J. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *Adv Exp Med Biol.* 2010;683:85-95. doi:10.1007/978-1-4419-6445-8\_8, 2010.

DORIGO, A. S. DE SOUZA ROSA-FONTANA, A., SOARES-LIMA, H. M., DAI P, JACK CJ, MORTENSEN AN, ELLIS JD. Acute toxicity of five pesticides to *Apis mellifera* larvae reared in vitro. *Pest Manag Sci*. 2017 Nov;73(11):2282-2286. doi: 10.1002/ps.4608. Epub 2017 Jul 24. PMID: 28485079.

DORIGO, A., ROSA-FONTANA, A., CAMARGO, I., NOCELLI, R., & MALASPINA, O. Biological Data of Stingless Bees with Potential Application in Pesticide Risk Assessments. *Sociobiology*, 65(4), 777-779, 2018

EATON, D.L, BAMMLER, T.K. (1999) Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol. Sci*. 49:156-164

ELLMAN G.L., COURTNEY K. D., ANDRES V., FEATHERSTONE R. M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961.

FARIA, L. B. D., ALEIXO, K. P., GARÓFALO, C. A., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., & SILVA, C. I. D. Foraging of *Scaptotrigona aff. depilis* (Hymenoptera, Apidae) in an urbanized area: Seasonality in resource availability and visited plants. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012.

GALASCHI-TEIXEIRA, J. S., NOCELLI, R. C. F., MALASPINA, O. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PloS one*, 14(3), e0213109, 2019.

GAUTHIER, M.; ARAS, P.; PAQUIN, J.; BOILY, M. Chronic exposure to imidacloprid or thiamethoxam neonicotinoid causes oxidative damages and alters carotenoid-retinoid levels in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Sci Rep* 8:1–11. doi: 10.1038/s41598-018-34625-y, 2018.

GODFRAY, H.C.J., BLACQUIRE, T., FIELD, L.M., HAILS, R.S., PETROKOFISKY, G., et al. (2014) A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc. R. Soc. B* 281(1786), 20140558

IBAMA. Avaliação de risco de agrotóxicos para insetos polinizadores e lacunas de conhecimento. Ministério do Meio Ambiente e Instituto Brasileiro dos Recursos Naturais Renováveis, 2017. <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/noticias2017/notecnicaavaliacaoderiscoagrototoxicos.pdf>>. Acessado em 30 abril 2019

ISHAAYA, I.; BARAZANI, A.; KONTSEDALOV, S.; HOROWITZ, A.R. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. *Entomol Res* 37:148–152. doi: 10.1111/j.1748-5967.2007.00104.x, 2007.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; SARAIVA, A.M.; DE JONG, D. Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. *Ribeirão Preto: Holos*, p. 112, 2006.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. *Abelha Uruçu - Biologia, Manejo E Conservação*. 2. ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: Fundação Acangaú, 1996.

KERR, W. E. et al. Aspectos pouco mencionados da biodiversidade amazônica. *Parcerias estratégicas*, v. 80, p. 45–60, 2001.

KEVAN, PETER G; IMPERATRIZ-FONSECA. *POLLINATING BEES THE CONSERVATION LINK BETWEEN AGRICULTURE AND NATURE*. Ministério do Meio Ambiente, p. 313, 2002.

LALLES, J.P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.* 68:323-332, 2010.

LI, Z.; LI, M.; He, J.; Zhao, X.; CHAIMANEE, V.; HUANG, W.F.; NIE, H.; ZHAO, Y.; SU, S. Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: a comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 140, pp. 1-8, 10.1016/j.pestbp.2017.06.010, 2017.

NOCELLI, R. C. F., MALASPINA, O., CARVALHO, S. M., LOURENÇO, C. T., ROAT, T. C., PEREIRA, A. M., & SILVA-ZACARIN, E. C. M. *As abelhas e os defensivos agrícolas*. Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Saraiva AM *Polinizadores no Brasil– contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais*. EDUSP, São Paulo, 2012.

KLINGENBERG, Christian Peter; MCINTYRE, Grant S.; ZAKLAN, Stefanie D. Left-right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v.265, n.1402, p.1255-1259, 1998.

KREMEN, CLAIRE; WILLIAMS, NEAL M.; THORP, ROBBIN W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99.26: 16812-16816, 2002.

MAIENFISCH, P.; ANGST, M.; BRANDL, F.; FISCHER, W.; HOFER, D.; KAYSER, H.; KOBEL, W.; RINDLISBACHER, A.; SENN, R.; STEINEMANN, A.; WIDMER, H. *Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid*. *Pest Management Science*, v. 57, p. 906-913, 2001.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell makers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, São Paulo, v.23, n.3/4, p.303-309, 2006.

MICHENER C.D. (2013) *The Meliponini*. In: Vit P, Pedro SRM, Roubik D (eds) *Pot-honey: a legacy of stingless bees*. Springer, New York, pp 3–17

MOSS DW (1992) Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin. Chem.* 38:2486–2492

NEYENS, E.; BAEYENS, J. A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced

oxidation technique. J Hazard Mater 98:33–50. doi: 10.1016/S0304-3894(02)00282-0, 2003.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 445 p. 1997.

ROSA, A. Efeitos da exposição das abelhas Bombini, Apini e Meliponini ao neonicotinóide tiametoxam e uso de *Scaptotrigona aff. depilis* como bioindicador. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2014.

ROSA, A., l'ANSON PRICE, R., FERREIRA CALIMAN, M.J., PEREIRA QUEIROZ, E., BLOCHTEIN, B., SÍLVIA SOARES PIRES, C., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. The stingless bee species, *Scaptotrigona aff. depilis*, as a potential indicator of environmental pesticide contamination. Environ. Toxicol. Chem. 34(8), 1851–1853, 2015.

RUTTNER, F. Biogeography and taxonomy of honeybees. Springer-Verlag. Berlin, 1988.

SILVA, C.I.; ALEIXO. K.P; SILVA, B.N; FREITAS, B.M; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Guia ilustrado de abelhas polinizadoras no Brasil, Editora Fundação Brasil cidadão, 2014.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; RIBEIRO, M. N.; PADILLA-ÁLVAREZ, F.; FARIAS, E. S. L. & PEREIRA, W. E. 2009. Análises morfométricas entre *Apis mellifera* da microrregião do sertão Paraibano.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Documentos 42. EMBRAPA: CNPMA, Jaguariúna, 2004.

TOMÉ, H.V.V., BARBOSA, W.F., CORRÊA, A.S., GONTIJO, L.M., MARTINS, G.F., GUEDESS, R.N.C. Reduced-risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. Ann. Appl. Biol. . doi:10.1111/aab.12217, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. Annual Review of Entomology, v.48, p. 339-364, 2003.

VILLA, S.; VIGHI, M.; FINIZIO, A.; SERINI, G. B. Risk assessment for honeybees from pesticide- exposed pollen. Ecotoxicology, v. 9, p. 287-297, 2000.

WITTER, S. et al. As abelhas e a agricultura. – Porto Alegre: EDIPUCRS, 143 p. 2014.

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

  
(assinatura do aluno)

  
(assinatura do Coordenador)

  
(assinatura do Orientador)