
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e
melíferas ao flupiradifurona**

ADNA SUELEN DORIGO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

**Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e
melíferas ao flupiradifurona**

ADNA SUELEN DORIGO

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Roberta C. Ferreira Nocelli e Dr^a. Annelise de Souza Rosa-Fontana

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do
Campus de Rio Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências
Biológicas (Biologia Celular, Molecular e
Microbiologia).

D697a Dorigo, Adna Suelen

Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e melíferas ao flupiradifurona / Adna Suelen Dorigo. -- Rio Claro, 2022
93 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Osmar Malaspina
Coorientadora: Roberta C. Ferreira Nocelli ; Annelise Souza
Rosa-Fontana

1. Larvas de abelhas. 2. Biologia Molecular. 3. Biologia Celular. 4.
Ecotoxicologia. 5. Stingless bees. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e melíferas ao flupiradifurona

AUTORA: ADNA SUELEN DORIGO

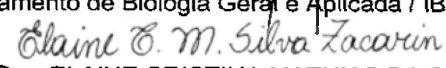
ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA

COORIENTADORA: ANELISE DE SOUZA ROSA FONTANA

COORIENTADORA: ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas, área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. OSMAR MALASPINA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro


Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)


Prof. Dr. JOSÉ BRUNO MALAQUIAS (Participação Virtual)
Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal da Paraíba - UFPB


Profa. Dra. LETÍCIA ROCHA GONÇALVES (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Rio Claro, 06 de dezembro de 2022

***Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me
deram suporte para ir atrás dos meus sonhos.***

Agradecimentos

Agradeço à Deus pelo dom da vida e por ter me permitido realizar este trabalho;

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pela lição de otimismo e determinação; sem vocês eu não teria chegado até aqui. Vocês têm todo meu amor, admiração e respeito.

À minha irmã Lilian e cunhado Marcos, pela amizade e generosidade, pelo companheirismo em todos os momentos;

Ao meu namorado Tiago, por sua amizade, apoio, paciência e motivação;

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela disposição em me orientar, por todo apoio e incentivo;

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Roberta pela oportunidade, amizade, incentivo, dedicação, paciência e atenção prestados; muito obrigada por me acolher e me fazer amar a ciência. Você sempre foi uma inspiração para mim. Minha primeira mãe-científica;

A minha coorientadora e amiga Dr^a. Annelise pela amizade, orientação, ajuda, paciência e conselhos sempre úteis quando eu estava em dúvida de qual caminho seguir. Obrigada pela amizade e companheirismo; espero que ainda viajemos muito juntas para aumentarmos nossas histórias malucas. Minha segunda mãe-científica;

À Tatiane Grella por toda amizade e companheirismo em todos os anos de pós-graduação; que a nossa amizade cresça a cada dia. Sem sua ajuda nada disso seria possível!

Ao Iago Bueno por sempre estar comigo quando precisei, por me ouvir e me ajudar;

A Ingrid por ser muito mais que uma prima, por ser minha amiga! Por sempre torcer por mim, sempre me ouvir e estar ao meu lado.

À Daiana Tavares por ter me ensinado as técnicas enzimáticas utilizadas neste trabalho, pelas discussões de resultados e pelos momentos de risada.

A todos do grupo do LECA (Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas), em especial a Pamela Decio, Nicole Butolo, Lucas Miotelo, Geovana Maloni e Isabella Camargo pelas risadas, parcerias, discussões e risadas, tudo isso ficará na memória.

A minha aluna de iniciação científica Daniela Simões, foi prazer trabalhar com você.

A minha amiga Mirian, por sua amizade de anos, sempre me incentivando e torcendo por mim, mesmo estando 3.000 km de distância.

As minhas amigas queridas Amanda, Gabrielle, Natália e Sãmela, os quais sempre me apoiaram e ajudaram em todos os momentos;

Ao técnico Sérgio Pascon por todos seus ensinamentos;

À Necis Miranda por me socorrer sempre que precisei; vou sentir falta de te falar bom dia todos os dias 7h da manhã. rs

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, assim como para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, pela concessão de espaço para execução dessa pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Realizar esse trabalho em tempos sombrios de pandemia não foi uma tarefa fácil, mas com a ajuda de todos consegui chegar até aqui. Obrigada a cada um que sempre esteve ao meu lado e me deram apoio/suporte para conseguir caminhar. Agora a jornada é outra!

***On ne voit bien qu'avec le cœur.
L'essentiel est invisible pour les yeux.***
Saint-Exupéry – Le petit Prince

Resumo

O atual cenário brasileiro de uso de agrotóxicos nos sistemas agrícolas, somado à necessidade do estabelecimento de políticas públicas de proteção a polinizadores, requer estudos sobre os potenciais efeitos destes produtos químicos sobre organismos não-alvo. Além de se avaliar as taxas de mortalidade, é essencial que possíveis efeitos subletais sejam considerados. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos: (i) compreender os possíveis efeitos subletais do inseticida flupiradifurona em larvas de abelhas *Apis mellifera*, *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica* expostas oralmente. (ii) analisar a atividade de biomarcadores enzimáticos em larvas expostas a doses realistas de campo do inseticida flupiradifurona. (iii) avaliar o impacto da exposição do flupiradifurona na fase larval e em abelhas recém-emergidas sobre o sistema imune das abelhas, por meio da contagem de hemócitos. Para tanto, (i) larvas das espécies *A. mellifera*; *S. postica* e *M. scutellaris* foram expostas ao inseticida Flupiradifurona (grupo D - 0,77 ng i.a/μL de alimento; grupo DC 7,7 ng i.a/μL de alimento). Foram observados os efeitos de acordo com a progressão das fases de desenvolvimento: 5ª instar larval; defecação; taxa de mortalidade; taxa de pupação; taxa de emergência; mudança na coloração de olhos das pupas e; tempo em cada fase de desenvolvimento. Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas no software RStudio. Os resultados demonstraram que o flupiradifurona afetou significativamente todos os parâmetros larvais em ambos os grupos expostos, quando comparados ao controle demonstrando que o flupiradifurona pode ser considerada tóxica para abelhas em sua fase de desenvolvimento. (ii) larvas das espécies *A. mellifera*; *S. postica* e *M. scutellaris* foram expostas ao inseticida Flupiradifurona (grupo D - 0,77 ng i.a/μL de alimento; grupo DC 7,7 ng i.a/μL de alimento) e 15 delas foram coletadas 24 horas após o término da alimentação. Foram realizadas a modulação da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GP), carboxilesterase (CaEs p), glicose-6- fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathione s- transferase (GST), glicose oxidase (GOX), fenol oxidase (POX) e fosfatase alcalina (PAL). Os resultados mostraram sua eficácia na identificação de efeitos subletais, apontando diferentes respostas da exposição para as espécies de abelhas analisadas. Dessa forma, o uso dessas ferramentas moleculares demonstra grande potencial para serem incluídas em futuras decisões de órgãos regulatórios para análise de risco. (iii) larvas das espécies *A. mellifera*; *S. postica* e *M. scutellaris* foram expostas ao inseticida Flupiradifurona (grupo D - 0,77 ng i.a/μL de alimento; grupo DC 7,7 ng i.a/μL de alimento) e para este teste foram coletadas larvas 24 horas após o término da alimentação e abelhas recém-emergidas (24 horas após a emergência). Foi coletada

a hemolinfa desses indivíduos e adicionado ao corante azul de metileno para visualização em microscópio eletrônico. Através de análises estatísticas podemos inferir que o uso de flupiradifurona pode comprometer o sistema imune dessas abelhas, podendo levar a morte tanto do indivíduo quanto da colônia. Os resultados obtidos são inéditos e contribuem para o desenvolvimento de medidas protetivas para a conservação das espécies *A. mellifera*, *S. postica* e *M. scutellaris*, uma vez que este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da exposição larval ao flupiradifurona para essas espécies. Desse modo, esse trabalho fornece dados pioneiros para a literatura científica, com relevância a serem incluídos nas avaliações de risco ambientais realizadas pelo IBAMA.

Palavras-Chave: agrotóxico; *in vitro*; avaliação de risco; polinizadores

Abstract

The current Brazilian scenario of pesticide use in agricultural systems, added to the need to establish public policies to protect pollinators, requires studies on the potential effects of these chemicals on non-target organisms. In addition to assessing mortality rates, it is essential that possible sublethal effects are considered. Thus, the present study aimed to: (i) Understand the possible sublethal effects of the insecticide flupyradifurone on *Melipona scutellaris* and *Scaptotrigona postica* bee larvae through a comparison with the orally exposed *Apis mellifera* species; (ii) To analyze the activity of enzyme biomarkers in larvae exposed to realistic field doses of the insecticide flupyradifurone; (iii) To evaluate the impact of flupiradifurone exposure in the larval stage and in newly emerged bees on the bee's immune system, through hemocyte count. For this purpose, (i) larvae of the species *A. mellifera*; *S. postica* and *M. scutellaris* were exposed to the insecticide flupyradifurone (group D - 0.77 ng a.i./ μ L of food; group DC 7.7 ng a.i./ μ L of food). The effects were observed according to the progression of the development stages: 5th larval instar; defecation; mortality rate; pupation rate; emergency fee; change in pupae eye color and; time at each stage of development. The data obtained were submitted to statistical analysis in the RStudio software. The results showed that flupiradifurone significantly affected all larval parameters in both exposed groups, when compared to the control, demonstrating that flupiradifurone can be considered toxic to bees in their development phase. (ii) larvae of *A. mellifera* species; *S. postica* and *M. scutellaris* were exposed to the insecticide flupyradifurone (group D - 0.77 ng a.i./ μ L of food; group DC 7.7 ng a.i./ μ L of food) and 15 of them were collected 24 hours after the end of feeding. Modulation of the enzymatic activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GP), carboxylesterase (CaEs p), glucose -6- phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione s-transferase (GST), glucose oxidase (GOX), phenol oxidase (POX) and alkaline phosphatase (PAL). The results showed its effectiveness in the identification of sublethal effects, pointing out different exposure responses for the analyzed bee species. Thus, the use of these moleculares tools demonstrates great potential to be included in future decisions of regulatory bodies for risk analysis. (iii) larvae of *A. mellifera* species; *S. postica* and *M. scutellaris* were exposed to the insecticide flupyradifurone (group D - 0.77 ng a.i./ μ L of food; group DC 7.7 ng a.i./ μ L of food) and larvae were collected 24 hours after the end of the experiment. feeding and newly emerged bees (24 hours after emergence). Hemolymph from these individuals was collected and added to methylene blue dye for visualization under an electron microscope. Through statistical analysis we can infer in this study that the use of

flupiradifurone can compromise the immune system of these bees, which can lead to the death of both the individual and the colony. The results obtained are unprecedented and contribute to the development of protective measures for the conservation of the species *A. mellifera*, *S. postica* and *M. scutellaris*, since this study is the first to assess the effects of larval exposure to flupiradifurone for these species. In this way, this work provides pioneer data for the scientific literature, being relevant to be included in the environmental risk assessments carried out by IBAMA.

Keywords: pesticide; *in vitro*; risk assessment; pollinators

Sumário

Introdução geral	14
Objetivos e organização geral da tese.....	18
Referências	19
Capítulo 1	22
1. Introdução.....	22
2. Materiais e Métodos.....	26
Coleta do material biológico para bioensaios in vitro	26
Obtenção das concentrações realistas de campo para o Flupiradifurona	27
Bioensaios in vitro com <i>Apis mellifera</i>	27
Bioensaios in vitro com espécies sem ferrão: <i>Melipona scutellaris</i> e <i>Scaptotrigona postica</i>	29
Análises estatísticas	30
3. Resultados e Discussão	31
Taxas de mortalidade e desenvolvimento	31
Tempo de desenvolvimento	36
4. Conclusão	39
5. Referências:.....	39
Capítulo 2	48
1. Introdução:.....	48
2. Materiais e Métodos.....	53
Coleta do material biológico para bioensaios in vitro	53
Obtenção das concentrações realistas de campo para o Flupiradifurona	53
Bioensaios in vitro com <i>Apis mellifera</i>	54
Bioensaios in vitro com espécies sem ferrão: <i>Melipona scutellaris</i> e <i>Scaptotrigona postica</i>	54
Análises estatísticas	54
Análise das atividades enzimáticas	54
3. Resultados.....	57
4. Discussão.....	66
5. Conclusão	69
6. Referências.....	69
Capítulo 3	78
1. Introdução:.....	78
2. Materiais e Métodos:.....	81
Coleta do material biológico para bioensaios in vitro	81

Obtenção das concentrações/doses realistas de campo para a Flupiradifurona	82
Bioensaios in vitro com <i>Apis mellifera</i>	82
Bioensaios in vitro com espécies sem ferrão: <i>Melipona scutellaris</i> e <i>Scaptotrigona postica</i>	82
Coleta de hemolinfa	82
Contagem total de hemócitos.....	83
Análises estatísticas	83
3. Resultados e discussão	83
4. Conclusão	88
5. Referências.....	88
Considerações finais	94

Introdução geral

A polinização animal aumenta a produção agrícola global em 235-577 bilhões de dólares anualmente (IPBES, 2016) e pode melhorar a qualidade dos frutos (Klatt et al., 2014). Além disso, abelhas e outros insetos que retiram seus alimentos de flores desempenham um papel importante na ecologia, pois são importantes polinizadores, contribuindo assim para a biodiversidade (Biesmeijer et al., 2006; Devillers, 2002). O declínio dos insetos polinizadores (Goulson, Nicholls, Botías, & Rotheray, 2015) é, portanto, uma preocupação não apenas para a agricultura, mas também para a conservação da natureza.

O Brasil abriga inúmeras espécies de abelhas, com os mais diferentes hábitos, tamanhos e graus de organização, sendo que a mais conhecida é a espécie introduzida *Apis mellifera*, considerada generalista, com capacidade de coletar alimento em diversos tipos de flores. Por este motivo, é reconhecida como o polinizador agrícola mais utilizado no mundo, visto que sua distribuição geográfica é global (Gallai et al., 2009; Brittain, C; Potts, 2011). No entanto, esta espécie não é nativa do Brasil, sendo assim, o uso desta espécie em áreas de cultivo aumenta a competição pela busca de alimentos pelas espécies sem ferrão (IBAMA, 2017).

Melipona scutellaris é uma espécie de abelha sem ferrão que tem a capacidade de realizar a polinização por vibração, ato que consiste em vibrar a musculatura torácica para agitar as anteras, o que possibilita a saída do pólen. Esse tipo de polinização é essencial para plantas com anteras poricidas, onde o pólen apenas é liberado por poros apicais (Nunes-Silva & Imperatriz-Fonseca, 2010). Essa espécie está incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção. *Scaptotrigona postica* é uma espécie de abelha nativa do Brasil, a qual possui distribuição climática tropical e subtropical, sendo observada na maior parte da América Latina. A referida espécie é um importante polinizador de culturas como café e citros (Nogueira-Neto, 1997).

Quando abelhas são expostas a inseticidas, caso seu efeito não seja letal, podemos observar efeitos subletais, nem sempre perceptíveis, que podem agir tanto no comportamento quanto na fisiologia das abelhas (Spadotto et al., 2004). Por consequência, comprometem a estrutura social e o desenvolvimento da colônia (Nominato, 2012).

O contato das abelhas com os agrotóxicos pode ocorrer tanto *in crop*, quanto *off crop*. O contato *in crop* normalmente ocorre devido a pulverização sobre o indivíduo,

durante o forrageamento, principalmente em plantações com florações; pelo contato com partes das plantas contaminadas, como as folhas e flores; por consumo de pólen e néctar contaminados, que pode ter ocorrido durante a pulverização, ou também pela translocação de produto sistêmico pela planta (Cham et al., 2017). Já o contato *off crop* está bastante associado à deriva das partículas de agrotóxicos aplicadas nas plantações, que podem atingir área próximas aos cultivos agrícolas, onde há o forrageamento desses polinizadores, promovendo sua contaminação tanto pelo contato direto com a poeira advinda da deriva, quanto pelo contato com plantas contaminadas, ou pelo consumo de néctar e pólen contaminados com a poeira da deriva (Cham et al., 2017; Pacífico-da-Silva et al., 2016).

Os agrotóxicos são considerados uma das principais causas do declínio de polinizadores, embora haja outras causas, como, parasitas, pragas, mudanças climáticas e intensificação da agricultura (Goulson et al., 2015). Com o banimento dos principais neonicotinoides no mercado europeu, houve o lançamento de substâncias alternativas. O flupiradifurona – FPF ($C_{12}H_{11}ClF_2N_2O_2$), por exemplo, é um novo agrotóxico lançado que pertence à nova classe química de butenolídeos e é altamente eficaz contra insetos sugadores, principalmente moscas-brancas e pulgões (Nauen et al., 2015). Semelhante aos neonicotinoides, a FPF se liga aos receptores nicotinérgicos de acetilcolina no cérebro do inseto e atua como um agonista reversível (Nauen et al., 2015). A ativação dos receptores de acetilcolina leva à despolarização e, eventualmente, ao bloqueio da transmissão sináptica das sinapses colinérgicas (Casida, 2018).

O FPF é relatado como relativamente seguro para as abelhas europeias, *A. mellifera* (Campbell et al., 2016; Glaberman e White, 2014). Porém, há evidências crescentes de efeitos prejudiciais para polinizadores benéficos, como as abelhas, que são amplamente usadas para polinizar culturas agrícolas tratadas com FPF. Este agrotóxico pode reduzir a sobrevivência e está associado à expressão alterada de genes imunes e de desintoxicação nas abelhas (Al Naggar e Baer, 2019). O FPF também tem vários efeitos comportamentais que podem prejudicar a capacidade de voo das abelhas (Tong et al., 2019) e aumentar comportamentos anormais (Tosi e Nieh, 2019).

Hesselbach & Scheiner (2018) mostraram que a exposição aguda a uma dose alta e não realista de FPF e (1.2 µg/ bee) prejudicou o paladar e a cognição das abelhas. Tan et al. (2015) demonstraram que a exposição crônica ao FPF prejudicou o aprendizado olfativo em larvas (0,033 µg/larvae) e adultas (0,066 µg/bee) de abelhas asiáticas (*Apis cerana*) em doses realistas em campo. Campbell et al. (2016) testaram os efeitos do FPF

em um estudo de campo nos EUA e não observaram efeitos colaterais significativos na colônia de abelhas, porém foram encontrados néctar e pólen contaminados com FPF.

Uma das maneiras para se avaliar a exposição aos agrotóxicos é a utilização de indicadores biológicos, que podem ser definidos como uma alteração (molecular, bioquímica, celular ou fisiológica) numa resposta biológica de um organismo, decorrente da exposição as substâncias tóxicas encontradas no ambiente (RYAN et al., 2007; ISLAS-FLORES et al., 2013). Algumas enzimas tais como acetilcolinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), carboxilesterases (CaEs) e fosfatase alcalina (PAL), estão envolvidas nos processos fisiológicos e, no caso da GST e CaES, diretamente com a desintoxicação metabólica (Claudianos et al., 2006; Oakeshott et al., 2005; Ranson et al., 2005). A análise das atividades das enzimas mencionadas, consistem em parâmetros bioquímicos que, ao serem avaliadas em conjunto, constituem uma importante ferramenta para a detecção de perturbações fisiológicas e para o diagnóstico do efeito de pesticidas em abelhas (Badiou-Bénéteau et al., 2012).

Outro mecanismo de avaliação é a resposta imune, por meio da alteração no número de hemócitos, principais representantes da imunidade celular que se encontram livres na hemolinfa ou aderidos à parede dos órgãos (Lavine; Strand, 2002; Cruz-Landim, 2009). Os hemócitos também estão envolvidos no processo de cicatrização (Krautz; Arefin; Theopold, 2014; Dubovskiy et al., 2016).

Apis mellifera foi adotada como organismo modelo para testes de avaliação de risco no Brasil. No entanto, dentre as principais incertezas apontadas pelo IBAMA (2017), destaca-se sua utilização, uma vez que as abelhas sem ferrão fazem parte da fauna nativa de polinizadores, sendo que uma forma elucidar essa dúvida seria a realização de uma comparação entre *A. mellifera* e espécies sem ferrão, no que se refere à toxicidade e exposição aos agrotóxicos.

As abelhas utilizadas nesse estudo foram escolhidas com base na lista de espécies prioritárias para avaliação de risco de agrotóxicos, publicada pelo IBAMA, que leva em consideração diversos parâmetros, tais como importância como polinizadores, associação com cultivos agrícolas, etc. As espécies *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) e *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) constam na referida lista entre as cinco principais. Entretanto, os indivíduos de *T. spinipes* têm comportamento agressivo e não existe método de criação em caixas de madeira (criação racional). Assim, *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) se mostra como espécie viável de ser estudada, uma vez que apresentam similaridades morfológicas e biológicas com *T. spinipes*.

Diante da contextualização apresentada, o presente estudo visou compreender quais são os impactos que a exposição a doses realistas de campo do FPF, o que esses impactos causam em diferentes fases de abelhas ferrão (*M. scutellaris* e *S. postica*) e *A. mellifera*, e também utilizando de um comparativo entre as espécies para que se possa compreender se a espécie exótica é realmente um organismo que pode ser considerado modelo na avaliação de risco de polinizadores no Brasil.

Objetivos e organização geral da tese

Com base na atual necessidade de conhecimento sobre informações biológicas acerca de abelhas sem ferrão e na demanda para a realização de estudos na fase imatura de espécies de abelhas brasileiras, a presente pesquisa tem como objetivos principais: (i) compreender os possíveis efeitos subletais do inseticida flupiradifurona em larvas de abelhas *Apis mellifera*, *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica* expostas oralmente; (ii) analisar a atividade de biomarcadores enzimáticos em larvas expostas a doses realistas de campo do inseticida flupiradifurona; (iii) avaliar o impacto da exposição do flupiradifurona na fase larval e em abelhas recém-emergidas sobre o sistema imune das abelhas, por meio da contagem de hemócitos.

A tese será apresentada em três capítulos. O primeiro apresenta os efeitos subletais do inseticida flupiradifurona em larvas de abelhas nativas e exótica e será submetido ao periódico *Environmental Pollution*. O segundo apresenta análises enzimáticas em larvas de abelhas expostas ao inseticida flupiradifurona, e será submetido ao periódico *Ecotoxicology and Environmental Safety*. O terceiro apresenta uma avaliação do sistema imune das larvas e abelhas recém-emergidas quando expostas ao Flupiradifurona.

Referências

- AL NAGGAR, Yahya; BAER, Boris. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- BADIOU-BÉNÉTEAU, Alexandra et al. 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.
- BIESMEIJER, Jacobus C. Et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 351-354, 2006.
- BRITTAIN, Claire; POTTS, Simon G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, v. 12, n. 4, p. 321-331, 2011.
- CAMPBELL, Jacob B. et al. The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. *Journal of insect physiology*, v. 86, p. 11-16, 2016.
- CASIDA, John E. Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects. **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 125-144, 2018.
- Cham, K. D. O., Rebelo, R. M., Oliveira, R. D. P., Ferro, A. A., Viana-Silva, F. D. C., Borges, L. D. O., ... & Macedo, T. C. (2017). Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. *Brasília: Ibama/Diqua*, 105.
- CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, USA, v. 5, n. 15, p.615-636, 2006
- DA CRUZ LANDIM, Carmina. Abelhas. Unesp, 2009.
- DEVILLERS, James; PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà (Ed.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. CRC Press, 2002.
- DUBOVSKIY, I. M. et al. Encapsulation and nodulation in insects. **Invertebrate Survival Journal**, v. 13, n. 1, p. 229-246, 2016.
- ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 3-8, 2005.
- GALLAI, Nicola et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological economics**, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.

GLABERMAN, S.; WHITE, K. Environmental fate and ecological risk assessment for foliar, soil drench, and seed treatment uses of the new insecticide flupyradifurone (byi 02960). US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division EFED, Environmental Risk Branch IV, v. 187, 2014.

Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C. & Rotheray, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* (80-347), 1255957–1255957 (2015).

HESSELBACH, Hannah; SCHEINER, Ricarda. Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; NUNES-SILVA, Patrícia. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 59-62, 2010.

ISLAS-FLORES, Hariz et al. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 92, p. 32-38, 2013.

IPBES. 2016. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Potts SG et al., eds. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany.

KLATT, Björn K. et al. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1775, p. 20132440, 2014.

KRAUTZ, Robert; AREFIN, Badrul; THEOPOLD, Ulrich. Damage signals in the insect immune response. **Frontiers in plant science**, p. 342, 2014.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

NAUEN, Ralf et al. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest management science*, v. 71, n. 6, p. 850-862, 2015.

NIEH, James C.; TOSI, Simone. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, v. 237, p. 124408, 2019.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. 1997.

NOMINATO, Fellipe Chaves. Estudo da ação do inseticida Tiametoxam na sobrevivência e no comportamento de operárias de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) em diferentes idades. 2012.

OAKESHOTT, John G. Et al. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin-and carboxyl-esterases. **Chemico-Biological**

PACÍFICO-DA-SILVA, Idalécio; MELO, Marília Martins; BLANCO, Benito Soto. Efeitos tóxicos dos praguicidas para abelhas. **Revista brasileira de higiene e sanidade animal**, v. 10, n. 1, p. 142-157, 2016

RYAN, P. B.; BURKE, T. A.; HUBAL, E. A. C.; CURA, J. J.; MCKONE, T. E. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, v. 155, n. 5, p. 833-840, 2007.

SPADOTTO, Claudio A. et al. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. 2004.

TAN, Ken et al. A neonicotinoid impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2015.

TONG, Linda; NIEH, James C.; TOSI, Simone. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, v. 237, p. 124408, 2019.

Capítulo 1

O artigo referente a este capítulo será submetido para publicação na Environmental Pollution.

Doses realistas de campo de Flupiradifurona podem afetar o desenvolvimento de abelhas melíferas e sem ferrão?

DORIGO, A.S.¹, ROSA-FONTANA A.S.¹, GRELLA, T.C¹ NOCELLI, R.C.F.², MALASPINA, O.¹

¹ Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-SP), Rio Claro, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-SP), Araras, SP, Brasil.

1. Introdução

Dentre os insetos polinizadores, sabe-se que as abelhas se destacam como polinizadoras de ambientes naturais e agroecossistemas. No Brasil, além da espécie exótica *Apis mellifera* africanizada Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apoidea), existem também aproximadamente 3000 espécies de abelhas, dentre as quais 244 espécies são abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini), pertencentes a 29 gêneros, e cerca de 87 são endêmicas do Brasil, correspondendo a 20% das espécies estimadas de abelhas sem ferrão neotropicais (Silva et al., 2014; Pedro et al., 2014). Dentre elas, temos a *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 e *Scaptotrigona postica*, Latreille, 1807 (Menezes et al., 2013; Michener, 2007).

A espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille, 1807, conhecida como Mandaguari, possui ampla distribuição geográfica, incluindo o estado de São Paulo. (Kerr et al., 1996; Nogueira-Neto, 1997; Camargo & Pedro, 2013). A espécie em questão, realiza um importante papel na polinização de melancia (*Citrullus lanatus* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), cebola (*Allium cepa* L.), café (*Coffea arabica* L.), entre outras (Macieira & Proni, 2004; BPBES, 2019).

A espécie *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, conhecida como uruçú ou uruçú-nordestina, é endêmica do nordeste do país, mas tem se adaptado bem ao sudeste, onde foi introduzida por meliponicultores (Pigozzo & Viana, 2010). Essa espécie apresenta um elevado potencial como agente polinizador e produtor de mel, sendo ainda considerada uma espécie potencial para ser utilizada como polinizadora em ambiente protegido ou campo aberto (Imperatriz-Fonseca; Saraiva; De Jong, 2006). Essa espécie tem a capacidade de realizar a “polinização por vibração”, ato que consiste em vibrar a musculatura torácica para agitar as anteras das flores, o que possibilita a liberação do pólen. (Nunes-Silva & Imperatriz-Fonseca, 2010). A referida espécie pode polinizar culturas como café (*Coffea arabica* L.), morango (*Fragaria spp.*), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum*) (Slaa et al, 2006).

Os meliponíneos são responsáveis por 90% da polinização de espécies nativas em ecossistemas como a Mata Atlântica e contribuem para a manutenção dos sistemas naturais (Felix et al. 2021). Nas últimas décadas, foi registrado um declínio mundial no número de abelhas (Goulson et al., 2008; Martins e Melo, 2010; Pires et al., 2016; Chan e Raine, 2021). Como as abelhas são responsáveis pela manutenção de 73% das lavouras cultivadas no mundo e por inúmeras espécies de plantas silvestres devido ao seu serviço de polinização (IPBES, 2019), a diminuição da população de abelhas ameaça a estabilidade da produção primária nos ecossistemas (Lippert et al., 2021; Reilly et al., 2020).

Esse declínio está associado a múltiplos fatores, como doenças, aumento de áreas urbanas, mudanças climáticas e uso inadequado e extensivo de agrotóxicos na agricultura (Jaffé et al., 2015; Kok et al., 2017; Potts et al., 2010; Goulson et al., 2015; IPBES, 2016; Brito et al., 2020; Fortuin et al., 2021). 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 por meio da coleta de pólen, néctar e outros recursos florais contaminados, os quais as operárias levam para dentro das colônias. Dessa forma, pode ocorrer a contaminação das larvas, decorrente do consumo de alimento larval elaborado com os recursos florais contaminados, estocados estes no interior da colônia.

Para mitigar o declínio das abelhas, a avaliação de risco ambiental (ARA) está sendo adotada nos procedimentos de registro e regulamentação do uso de agrotóxicos na agricultura em escala global (por exemplo, Brasil EUA e União Europeia) (Cham et al., 2020; EFSA, 2013a). Para realizar uma ARA, é crucial entender os efeitos dos produtos

químicos sobre os organismos de interesse e as formas nas quais eles podem ser expostos a esses produtos químicos.

Desde o início dos estudos sobre a toxicidade dos agrotóxicos para as abelhas, a maioria dos resultados obtidos foram provenientes de estudos com a espécie modelo *A. mellifera*. Porém, há indícios de que os resultados obtidos para *A. mellifera* não devem ser estendidos às abelhas sem ferrão (Ratto et al., 2017; Cham et al., 2019).

Os agrotóxicos têm recebido atenção porque visam combater insetos-praga (Jeschke e Nauen, 2008), mas podem prejudicar insetos benéficos, que são considerados não-alvo. As abelhas podem polinizar culturas tratadas com agrotóxicos como fonte de alimento e com isso ficam amplamente expostas aos resíduos químicos (Tosi et al., 2018); à deriva das culturas (David et al., 2016), que persistem no ambiente mesmo após o uso de agrotóxicos ter cessado. (Sanchez-Bayo, 2014).

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo desde 2008. Só em 2019, foram registrados 474 novos produtos, sendo que pelo menos 28 desses estão banidos da União Europeia (Pelaez et al., 2010; Arena & Sgolastra, 2014; Paumgarten et al., 2020; Campos et al., 2021). A comercialização e uso de agrotóxicos no Brasil cresce a cada ano e, de acordo com os dados do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais), foram vendidas 686.350 toneladas de ingredientes ativos no ano de 2020.

Um grupo de agrotóxicos em particular, os neonicotinoides, tem sido estudado por seu impacto negativo na saúde das abelhas (Pisa et al., 2017; Sanchez-Bayo, 2014). Os neonicotinoides afetam no sistema nervoso central de insetos, onde atuam como agonistas dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) e podem causar efeitos letais e subletais em abelhas (Crall et al., 2019, 2018; Pisa et al., 2017; Tosi et al., 2017a, 2016; Tosi e Nieh, 2017). A capacidade de voo das abelhas (duração, distância, velocidade média e máxima) também pode ser alterada pela exposição crônica ou aguda (Tosi et al., 2017a). Os neonicotinoides também alteram a termorregulação (Tosi et al., 2016; Crall et al., 2018; Potts et al., 2018), prejudicando a capacidade de regular a temperatura da colônia, podendo alterar os níveis de energia dos indivíduos (Tosi et al., 2017b) e o consumo de alimentos (Kessler et al., 2015; Tosi et al., 2017b; Tosi e Nieh, 2017).

Em resposta aos efeitos preocupantes dos neonicotinoides nas abelhas e à crescente resistência por parte das pragas, uma nova geração de agrotóxicos foi desenvolvida. O flupiradifurona (FPF), é um inseticida butenolídeo, com perfil quimicamente semelhante aos neonicotinoides (Giorio et al., 2017; Nauen et al., 2015).

Assim como os neonicotinoides, o FPF é sistêmico, ou seja, quando aplicado, se transloca com a seiva para todas as partes da planta, chegando ao néctar e pólen. De maneira semelhante, e se liga aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), embora suas relações de bioativação e atividade estrutural diferem de outros agonistas de nAChR (Goulson et al., 2013; Jeschke et al., 2015). O FPF é eficaz contra pragas resistentes aos neonicotinoides e é usado em diversas culturas como: algodão; batata; café; citros; melão; melancia; maracujá; morango; acerola; pimentão; soja; tomate; trigo; uva; e goiaba (Nauen et al., 2014; Tosi et al., 2021). A maioria dessas culturas dependem e/ou se beneficiam da polinização das abelhas.

O FPF é relatado como relativamente seguro para as abelhas europeias, *Apis mellifera*, (Campbell et al., 2016; Glaberman e White, 2014). Porém, há evidências crescentes de efeitos prejudiciais para polinizadores benéficos, como as abelhas, que são amplamente usadas para polinizar culturas agrícolas tratadas com FPF. Este agrotóxico pode reduzir a sobrevivência e está associado à expressão alterada de genes imunes e de desintoxicação nas abelhas (Al Naggar e Baer, 2019). O FPF também tem vários efeitos comportamentais que podem prejudicar a capacidade de voo das abelhas (Tong et al., 2019), aumentar comportamentos anormais (Tosi e Nieh, 2019) e criar deficiências motoras (Hesselbach e Scheiner, 2019). Assim como todos os neonicotinoides que compartilham o grupo cloropiridinil (imidacloprido, tiacloprid, acetamiprido e nitenpiram), o FPF compartilha um metabólito comum, o ácido 6-cloro nicotínico (6-CNA) que é tóxico para as abelhas, com uma $LC_{50} = 0,01$ ng/abelha/dia (Suchail et al., 2001; Ford et al., 2006).

Em consonância com pesquisas que mostram que abelhas doentes ou envenenadas podem apresentar suicídio altruísta por permanecerem mais tempo fora do ninho (Rueppell et al., 2010), a exposição crônica ao FPF pode levar ao forrageamento prematuro das abelhas (Hesselbach et al., 2020). O FPF, quando em altas concentrações, pode prejudicar o paladar e o olfato em *A. mellifera* (Hesselbach e Scheiner, 2018) e prejudicar o aprendizado em *Apis cerana*, quando expostas no período de desenvolvimento (larvas) ou adulto (Tan et al., 2017). No entanto, em doses mais baixas de FPF/abelha/ dia, a resposta não se mostra alterada (Bell et al., 2020), destacando a importância do uso correto das doses determinadas para o FPF.

Como parte do processo de registro para FPF, experimentos de Avaliação de Risco testaram os efeitos deste ingrediente ativo em abelhas (US EPA, 2014). No entanto, os procedimentos de avaliação de risco de agrotóxicos não testam completamente os efeitos

subletais dos produtos químicos (Decourtye et al., 2013; Tosi et al., 2021). Campbell et al. (2016) testaram os efeitos do FPF e não observaram efeitos colaterais significativos colônia de abelhas. No entanto, de acordo com o mesmo estudo, néctar e pólen coletados de abelhas de campos de controle também foram contaminados com FPF, enfatizando a dificuldade de se realizar ensaios ecotoxicológicos de campo confiáveis (Simon-Delso et al., 2017).

As evidências existentes e a demanda para a realização de estudos com meliponíneos vem aumentando substancialmente. Os órgãos responsáveis pela segurança ambiental requerem bioensaios apenas com *A. mellifera*, mas existe uma pressão crescente para que os testes passem a ser realizados com espécies brasileiras, principalmente aquelas com potencial para os serviços de polinização (Pires & Torezani, 2018; Cham et al., 2019).

Os dados sobre toxicidade de agrotóxicos para larvas de abelhas foram produzidos principalmente para *A. mellifera*, pois a mesma já conta com um método de criação adotado mundialmente (Aupinel et al., 2005; Aupinel et al., 2007; OECD, 2013). Os protocolos considerando abelhas nativas brasileiras estão disponíveis há pouco tempo (Dorigo et al., 2019; Rosa-Fontana et al., 2020) e as autoridades ambientais ainda não exigem seu uso na avaliação de risco de agrotóxicos.

No presente cenário buscamos entender os efeitos de concentrações realistas de campo desse novo ingrediente ativo (FPF) no desenvolvimento larval de três espécies de abelhas: *A. mellifera*, *M. scutellaris* e *S. postica*.

2. Materiais e Métodos

Coleta do material biológico para bioensaios *in vitro*

Favos com larvas das espécies *A. mellifera*, *M. scutellaris* e *S. postica* foram coletados de colônias não parentais do apiário e meliponário do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro. Para as coletas, foram selecionadas três colônias fortes, baseando-se no número de indivíduos e idade da rainha (jovem). A coleta foi realizada respeitando intervalos de 40 dias para a recuperação e desenvolvimento de novas operárias, visando não prejudicar a sanidade das colônias. Dessa forma, foram coletados favos contendo ovos, utilizados para a retirada do alimento larval, e favos contendo larvas de primeiro instar (recém-eclodidas) para bioensaios de criação *in vitro*.

Obtenção das concentrações realistas de campo para o Flupiradifurona

O ingrediente ativo (i.a.) utilizado nos bioensaios foi a Flupiradifurona PESTANAL® (C₁₂ H₁₁ClF₂N₂ O₂), padrão analítico Sigma-Aldrich, pureza $\geq 98,0\%$, lote: BCCB1463. Para os bioensaios, foram utilizadas concentrações realistas de campo, considerando a dose máxima recomendada para o produto. Para tanto, foram empregadas doses recomendadas pelo produto comercial para a cultura de café e tomate, respeitando seu modo de aplicação.

Para obter essa concentração realística de campo (DC), foi utilizado o BeeRex, desenvolvido pela US-EPA (United States Environmental Protection Agency), o qual foi incorporado para uso nas avaliações de risco pelo IBAMA. A partir disso, foi encontrada a concentração de 7,7 ng/ μ L de alimento larval (DC). Para os bioensaios, utilizou-se a concentração de 0,77 ng/ μ L (D), que corresponde a DC dividida 10 vezes. É importante salientar que tal ingrediente ativo é considerado como risco ambiental: III - Produto perigoso, conforme informações do perfil ambiental do produto (IBAMA, 2019).

Bioensaios in vitro com *Apis mellifera*

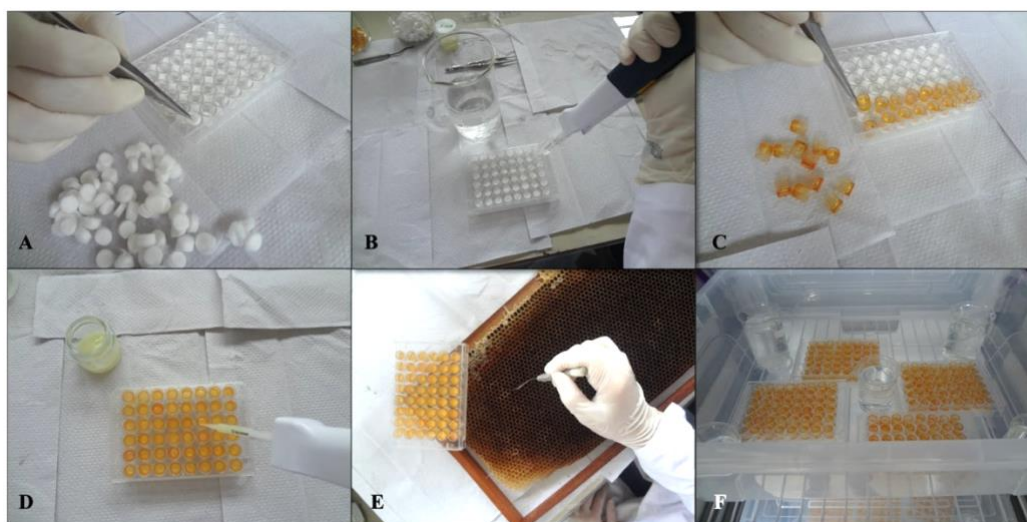
As larvas utilizadas no bioensaio foram coletadas de favos desoperculados, provenientes de três colônias diferentes, representando três repetições. Os favos de cria foram coletados e transportados ao laboratório no interior de uma caixa com temperatura acima de 20°C. As larvas de primeiro instar (L1), em ambiente esterilizado, foram transferidas delicadamente dos favos para as cúpulas (Figura 1). As larvas foram mantidas e criadas em cúpulas de poliestireno, também conhecidas como cúpulas de criação de rainha, previamente esterilizadas. As cúpulas foram dispostas em placas de cultura celular de 48 poços, as quais tinham cada poço forrado com $\frac{1}{4}$ de algodão dental esterilizado. O algodão dental foi embebido em 500 μ L de solução esterilizadora + 15% de glicerol (Figura 1)

As placas de cultura com as cúpulas foram acondicionadas dentro de uma caixa de polietileno hermeticamente fechada, contendo béqueres com solução saturada de K₂SO₄ para manutenção da umidade relativa e ausência de luz (Figura 1). Do Dia 1(D1) ao Dia 8 (D8), as larvas foram ser mantidas à 34 $\pm$ 1°C e umidade relativa de 95 $\pm$ 5%.

Os grupos experimentais foram realizados em triplicatas, contabilizando 30 larvas por réplica (3x30), totalizando 90 larvas por placa para cada grupo experimental. Em vista

disso, 270 larvas foram necessárias para realizar as transferências dos 3 grupos experimentais [Controle (Alimento puro); DC (7,7 ng/μL/dieta larval); DC/10 (0,77 ng/μL/dieta larval)]. Todas as larvas dos grupos contaminados receberam o alimento larval com o ingrediente ativo.

Figura 1: Descrição dos testes de toxicidade. (A) Algodões dentais sendo colocados nos poços da placa de cultura celular; (B) Algodões sendo embebidos em solução esterelizadora + glicerol; (C) Cúpulas sendo alocadas nos poços da placa de cultura celular; (D) Alimento sendo colocado nas cúpulas (E) Transferência das larvas para as cúpulas (F) Placas de cultura celular + cúpulas que receberam as larvas acondicionadas em caixa plástica contendo béqueres com água destilada e autoclavada.



No primeiro dia do experimento (D1), o volume de 15 μL da dieta A foi colocado em cada cúpula da placa. As larvas foram transferidas nas cúpulas contendo esse alimento, tomando cuidado para não as mergulhar. Todas as larvas foram alimentadas apenas uma vez por dia com a dieta variando ao decorrer do bioensaio (Tabela 1). O alimento deve ser ministrado mesmo que o alimento do dia anterior não tenha sido totalmente consumido, sendo que esse dado deve ser relatado. A exposição ao composto químico ocorreu no D4, solubilizado na dieta do tipo C.

Tabela 1 - Quantidade diária de alimento.

<i>Dia</i>	D1	D2	D3	D4*	D5
<i>Quantidade</i>	15 μL	15 μL	20μL	30μL	40μL
<i>Dieta (tipo)</i>	A	A	B	C	C

* Exposição oral ao Flupiradifurona. (Adaptado de Aupinel et al., 2005)

Bioensaios in vitro com espécies sem ferrão: *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica*

Para os bioensaios, foram utilizados os protocolos para desenvolvimento larval descritos por Dorigo et al. (2019) e Rosa-Fontana et al. (2020).

Os grupos experimentais foram realizados em triplicatas, contabilizando 30 larvas por réplica (3x30), totalizando 90 larvas por placa para cada grupo experimental. Em vista disso, 270 larvas foram necessárias para realizar as transferências dos 3 grupos experimentais [Controle (Alimento puro); DC (7,7 ng/μL/dieta larval); DC/10 (0,77 ng/μL/dieta larval)]. Todas as larvas dos grupos contaminados receberam o alimento larval com o ingrediente ativo.

Durante a manipulação dos favos para retirada do alimento e larvas, a sala foi mantida úmida para evitar que o alimento, os ovos e larvas desidratassem. Para isso, foi utilizado um recipiente com água mantida em fervura por dois ebulidores elétricos e um umidificador de ar.

Antes da transferência do alimento e das larvas, foram preparadas placas com 100 cavidades, as quais simulavam as células de cria, sendo as mesmas lavadas, esterilizadas e acondicionadas em placas de Petri de vidro (1,5x20 cm) tampadas com o fundo preenchido por água destilada. Este procedimento é essencial para manter a umidade entre 95±5% dentro da placa nos primeiros dias de incubação para ambas as espécies.

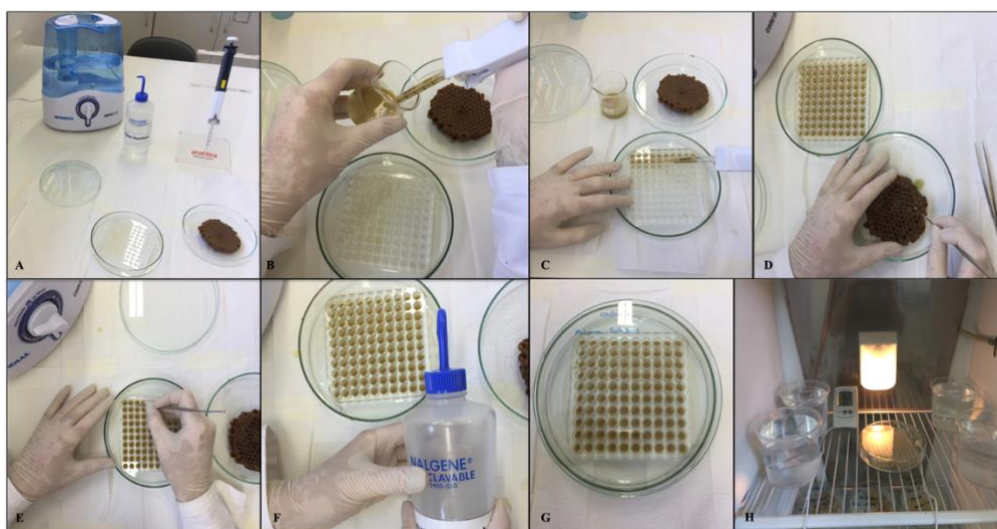
Sendo assim, favos de cria foram coletados das colônias mantidas nas caixas racionais e levados ao laboratório. As células contendo ovos foram desoperculadas, os mesmos foram removidos, e o alimento larval foi coletado com o auxílio de micropipeta automática. Em seguida, todo o alimento coletado foi misturado e homogeneizado (para cada espécie separadamente) para ser distribuído pelas placas com auxílio de uma micropipeta de repetição, sendo depositados 130 e 25 μL de alimento larval dentro de cada cavidade da placa de acrílico para *M. scutellaris* e *S. postica*, respectivamente (Dorigo et al., 2018). Logo após, as larvas foram transferidas com auxílio de uma agulha apícola (Figura 2).

Em *M. scutellaris*, após 5 dias de incubação, ou quando se notou o consumo total de alimento pelas larvas, a umidade dentro das placas foi reduzida para 75% por meio da adição de uma solução de NaCl à placa de Petri. Já em *S. postica*, após 72h da transferência, a umidade interna das placas foi reduzida para 75% com uma solução de cloreto de potássio (KCl). Após esse período foi realizada a substituição do KCl por

cloreto de sódio (NaCl) após 120h do período de incubação. Essas condições foram controladas com termo-higrômetro e mantidas até o final dos experimentos. Após realizada a transferência, as placas de Petri foram preenchidas com água destilada e mantidas em Estufa incubadora B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) a 30 ± 2 °C.

Os parâmetros biológicos foram observados e registrados após 24 horas da transferência larval até a emergência das abelhas, de acordo com o progresso do bioensaio. Os parâmetros biológicos foram: 5ª instar larval, defecação, taxa de pupação, taxa de emergência, coloração dos olhos e mortalidade.

Figura 2: Representação das fases experimentais da criação *in vitro* de abelhas das espécies *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica*. (A) Coleta de favos na caixa racional. (B) Preparação do ambiente para transferência. (C) Distribuição de alimento nas placas de acrílico. (D) Desoperculação do favo. (E) Transferência das larvas. (F) Acréscimo de água destilada à placa de Petri. (G) Larvas transferidas. (H) Experimento em andamento.



Análises estatísticas

Os dados não atenderam aos pressupostos das análises de variância (ANOVA), normalidade dos resíduos e homogeneidade, conforme os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Então, foram analisados por construção de modelos lineares generalizados (GLM).

Foram analisadas as taxas de mortalidade, pupação e a emergência dos adultos, entre os grupos controle e expostos ao agrotóxico. Para os seguintes dados foram calculadas a média e o erro padrão: (1) mortalidade das larvas/número inicial de larvas;

(2) pupas de olho branco/número inicial de larvas; (3) emergência das abelhas /número de pupas; e (4) emergência das abelhas/número inicial de larvas.

A distribuição utilizada foi a binomial para as taxas de mortalidade larval, pupação e emergência com relação ao número inicial de larvas. Para as taxas de emergência com relação ao número de pupas vivas foi utilizada a distribuição de *quasipoisson*. A adequabilidade dos dados em relação ao modelo foi conferida por meio da análise de resíduos utilizando o pacote HNP (Moral et al., 2017). A comparação dos grupos foi realizada pela análise de deviance e o efeito pós teste utilizando o ajuste de Tukey, sendo o nível de significância o valor de $p < 0,05$.

O tempo em cada fase de desenvolvimento durante a metamorfose foi analisado por meio de curvas de Kaplan-Meier, utilizando os pacotes survival e survminer (Therneau, 2022; Terry, 2000; Kassambara, et al., 2021). A comparação dos grupos foi feita pela regressão de cox e o pós teste pelo ajuste de Tukey. Para os dados mencionados, foi analisado o tempo nas fases: 5º instar, defecação, pupa de olho branco, pupa de olho rosa, pupa de olho marrom, pupa de olho preto e o tempo de emergência dos adultos. As análises foram realizadas no software estatístico RStudio versão 4.2.0 (R CORE TEAM, 2022).

3. Resultados e Discussão

Taxas de mortalidade e desenvolvimento

Foi possível observar o desenvolvimento das espécies de abelhas *Apis mellifera*, *Melipona scutellaris*, e *Scaptotrigona postica* (Figuras 3 e 4). Após a exposição larval ao agrotóxico, observou-se que o princípio ativo do inseticida interferiu no desenvolvimento pós-embrionário das abelhas (Tabela 2 - 5), afetando a taxa de pupação e emergência nos dois grupos experimentais e nas três espécies de abelhas estudadas.

Figura 3: Progressão do desenvolvimento larval: (A) Ovo em *Apis mellifera*; (B) Larva 24h após a eclosão do ovo (1º instar) em *Apis mellifera*; (C) Larva em 5º instar em *Apis mellifera*; (D) Ovo em *Melipona scutellaris*; (E) Larva 24h após a eclosão do ovo (1º instar) em *Melipona scutellaris*; (F) Larva em 5º instar em *Melipona scutellaris*; (G) Ovo em *Scaptotrigona postica*; (H) Larva 24h após a eclosão do ovo (1º instar) em *Scaptotrigona postica*; (I) Larva em 5º instar em *Scaptotrigona postica*.

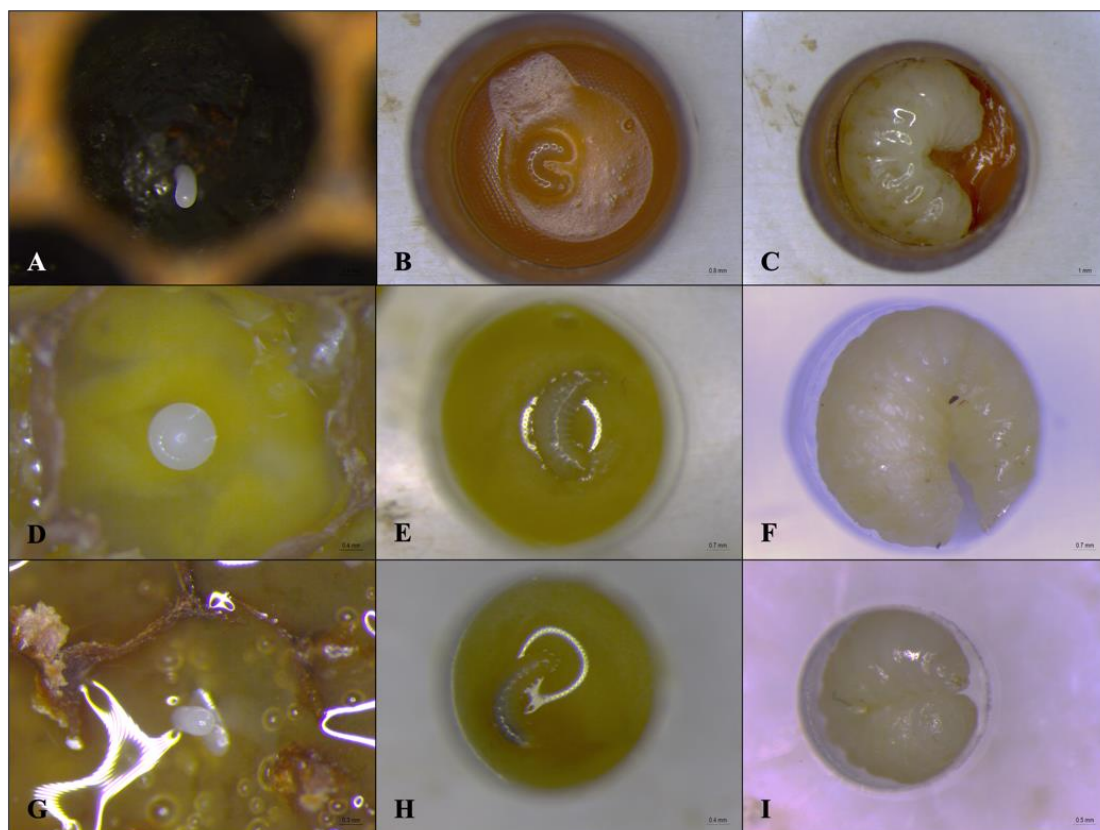


Figura 4: Fases de desenvolvimento: *Apis mellifera*: (A) Pupa de olho branco; (B) Pupa de olho rosa; (C) Pupa de olho marrom; e (D) Pupa de olho preto. *Melipona scutellaris*: (E) Pupa de olho branco; (F) Pupa de olho rosa; (G) Pupa de olho marrom; e (H) Pupa de olho preto. *Scaptotrigona postica*: (I) Pupa de olho branco; (J) Pupa de olho rosa; (K) Pupa de olho marrom; e (L) Pupa de olho preto.

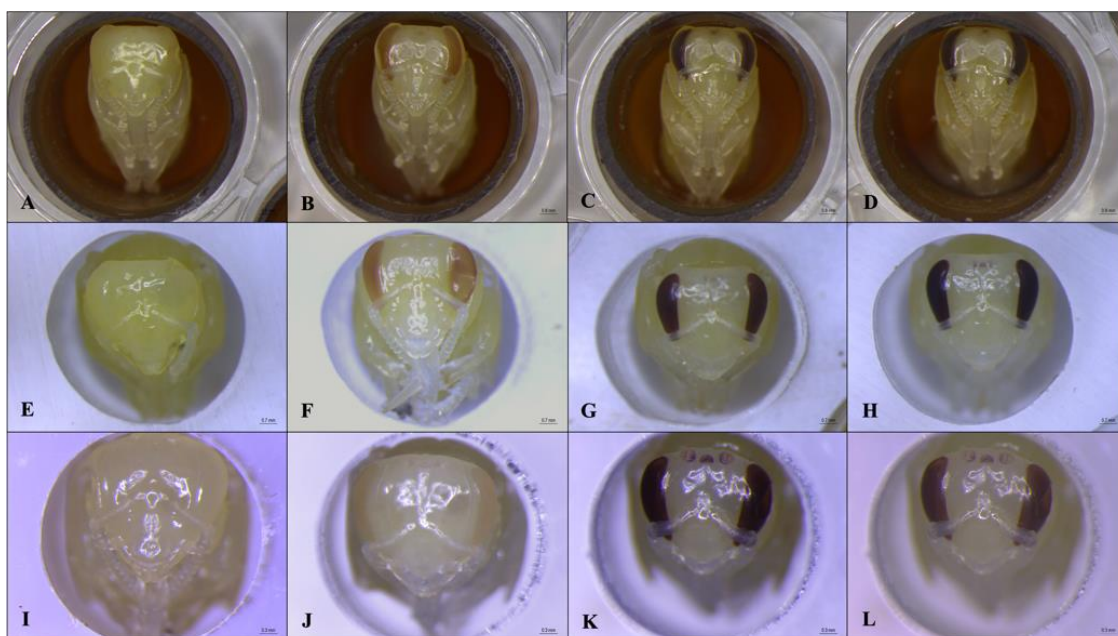


Tabela 2 - Taxas médias da mortalidade relativa (média $\pm$ erro padrão).

Grupo	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Scaptotrigona postica</i>
Controle	3 $\pm$ 0 a	0 $\pm$ 0 a	0 $\pm$ 0 a
D	19.3 $\pm$ 0.33 b	10 $\pm$ 0.6 b	11 $\pm$ 1.15 b
DC	30 $\pm$ 1.5 c	24 $\pm$ 1.5 c	27.7 $\pm$ 0.7 c

*Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, P significativo < 0,05.

Tabela 3 - Pupação: taxa de pupação calculada a partir do número de pupas de olho branco

Grupo	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Scaptotrigona postica</i>
Controle	93.7 $\pm$ 0 a	100 $\pm$ 0 a	100 $\pm$ 0 a
D	70.8 $\pm$ 3.2 b	82.7 $\pm$ 1.8 b	82 $\pm$ 2.3 b
DC	43.1 $\pm$ 0.7 c	63.3 $\pm$ 2.4 c	56 $\pm$ 2.31 c

*Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, P significativo < 0,05.

Tabela 4 - Emergência (larva): taxa de emergência calculada a partir do número inicial de larvas

Grupo	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Scaptotrigona postica</i>
Controle	100±0 a	100±0 a	100±0 a
D	59.7±0.7 b	80±1.1b	78±2.3 b
DC	37.5±3.2 c	52±3.1c	44.7±1.3 c

* Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, P significativo < 0,05.

Tabela 5 - Emergência (pupa): taxa de emergência calculada a partir do número inicial de pupas de olho branco.

Grupo	<i>Apis mellifera</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Scaptotrigona postica</i>
Controle	106.7±0 a	100±0 a	100±0 a
D	84.6±2.9 b	96.8±2.0 b	95.1±0.14 b
DC	87.3±8.4 c	82.0±3.0 c	79.8±1.6 c

* Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, P significativo < 0,05.

Esses dados mostram que o FPF interfere em todas as fases de desenvolvimento das abelhas, levando a não emergência de novos indivíduos, o que pode acarretar mortalidade da colônia. Além da mortalidade, há a possibilidade de malformação de indivíduos emergidos, como atrofia de asas, e com isso tornaria o indivíduo um polinizador não efetivo.

Larvas de *A. mellifera* africanizada expostas ao inseticida tiametoxam sofreram morte celular prematura em seus lobos ópticos (Tavares et al., 2015), podendo comprometer a acuidade visual e desorientação nas abelhas adultas ao processar uma quantidade menor de informações visuais nos corpos pedunculados.

Rosa e colaboradores (2016) mostraram que as larvas de *Scaptotrigona depilis* expostas à dose em nível realista de campo tiveram suas taxas de sobrevivência significativamente prejudicadas. No mesmo estudo foi observado que larvas e pupas tiveram o tempo de desenvolvimento mais curtos e mais longos, respectivamente, e houve a formação de espécimes menores e assimétricos.

Nesse contexto, Tomé et al. (2012) também relataram efeitos antagônicos do Imidacloprido em abelhas sem ferrão, mostrando redução significativa nas taxas de sobrevivência de larvas de *M. quadrifasciata anthidioide*. Além disso, Tavares et al.

(2015) mostraram que doses subletais de tiametoxam para abelhas podem causar progressão atípica dos estágios de desenvolvimento larval de *A. mellifera*.

Wu et al. (2011) relataram atraso no desenvolvimento de operárias de *A. mellifera* expostos a resíduos de agrotóxicos, incluindo neonicotinoides, e sugeriram que isso poderia ter consequências negativas a longo prazo, por exemplo afetando diversas atividades, como cuidados com a cria, processamento e armazenamento de alimentos, cuidados com rainhas, comportamento higiênico e eficiência de forrageamento.

Góngora-Gamboa et al. (2022) expuseram duas espécies de abelhas sem ferrão neotropicais, *Nannotrigona perilampoides* e *Frieseomelitta nigra*, a doses realistas de campo de FPF e observaram que a taxa de sobrevivência foi baixa e concluíram o FPF representa uma ameaça para as comunidades de abelhas sem ferrão.

Em estudos com FPF, Al Naggat & Baer (2019), descobriram que as exposições reduziram significativamente a sobrevivência das abelhas e alteraram a expressão de vários genes imunológicos e de desintoxicação. Eles concluíram que episódios curtos de exposições subletais à pesticidas durante o desenvolvimento são suficientes para desencadear efeitos mais tarde na vida e, portanto, podem vir a contribuir para o declínio generalizado na saúde das abelhas.

Em Tan et al. (2017), mostrou que os tratamentos de dose mais baixa que a dose de campo resultaram em deficiências significativas de aprendizado e memória, mostrando que as doses avaliadas reduziram o desempenho olfativo e a sobrevivência das abelhas na média de 35% na fase larval e de 20% a 50% na fase adulta. Yang et al. (2012) analisou os efeitos do Imidacloprido no aprendizado das abelhas foi observado que abelhas da espécie *Apis ceranae* reduziram o aprendizado olfativo proporcionalmente ao estudo de Tan et al. (2017).

As informações da literatura científica sobre os efeitos de FPF em abelhas ainda são incipientes. Os dados reais de campo atualmente disponíveis sobre o FPF, um inseticida sistêmico relativamente novo, são baseados na exposição de forrageiras adultas, o que é razoável, uma vez que as forrageadoras podem ser expostas ao FPF à medida que coletam néctar e pólen.

Trabalhos como Cham et al., (2018); Dorigo et al., (2019) e Rosa-Fontana et al., (2021) evidenciam a necessidade de outras fases de desenvolvimento serem estudadas para avaliação de risco de agrotóxicos, uma vez que as crias podem entrar em contato com o IA por meio de sua alimentação, a qual será elaborada com os recursos florais coletados em campo. Com isso, deixamos aqui um alerta para que mais testes que

envolvam abelhas sem ferrão e o ingrediente ativo FPF, pois a maioria dos estudos com este IA são com abelhas *Apis*, tornando este estudo pioneiro no uso de abelhas sem ferrão, FPF e desenvolvimento larval.

Tempo de desenvolvimento

Os resultados obtidos do tempo em cada fase de desenvolvimento apresentaram significância estatística para o 5ª instar larval para todas as espécies (Figura 5 A; D; G), defecação (Figura 5 B; E; H), taxa de emergência (Figura 5 C; F; I) e coloração de olhos (Figura 6) quando se comparam os grupos expostos com o grupo controle.

Figura 5: Parâmetros larvais: *Apis mellifera* - (A) atingiu 5º instar; (B) Taxa de defecação; (C) Taxa de Emergência. *Melipona scutellaris* - (D) atingiu 5º instar; (E) Taxa de defecação; (F) Taxa de Emergência. *Scaptotrigona postica* - (G) atingiu 5º instar; (H) Taxa de defecação; (I) Taxa de Emergência.

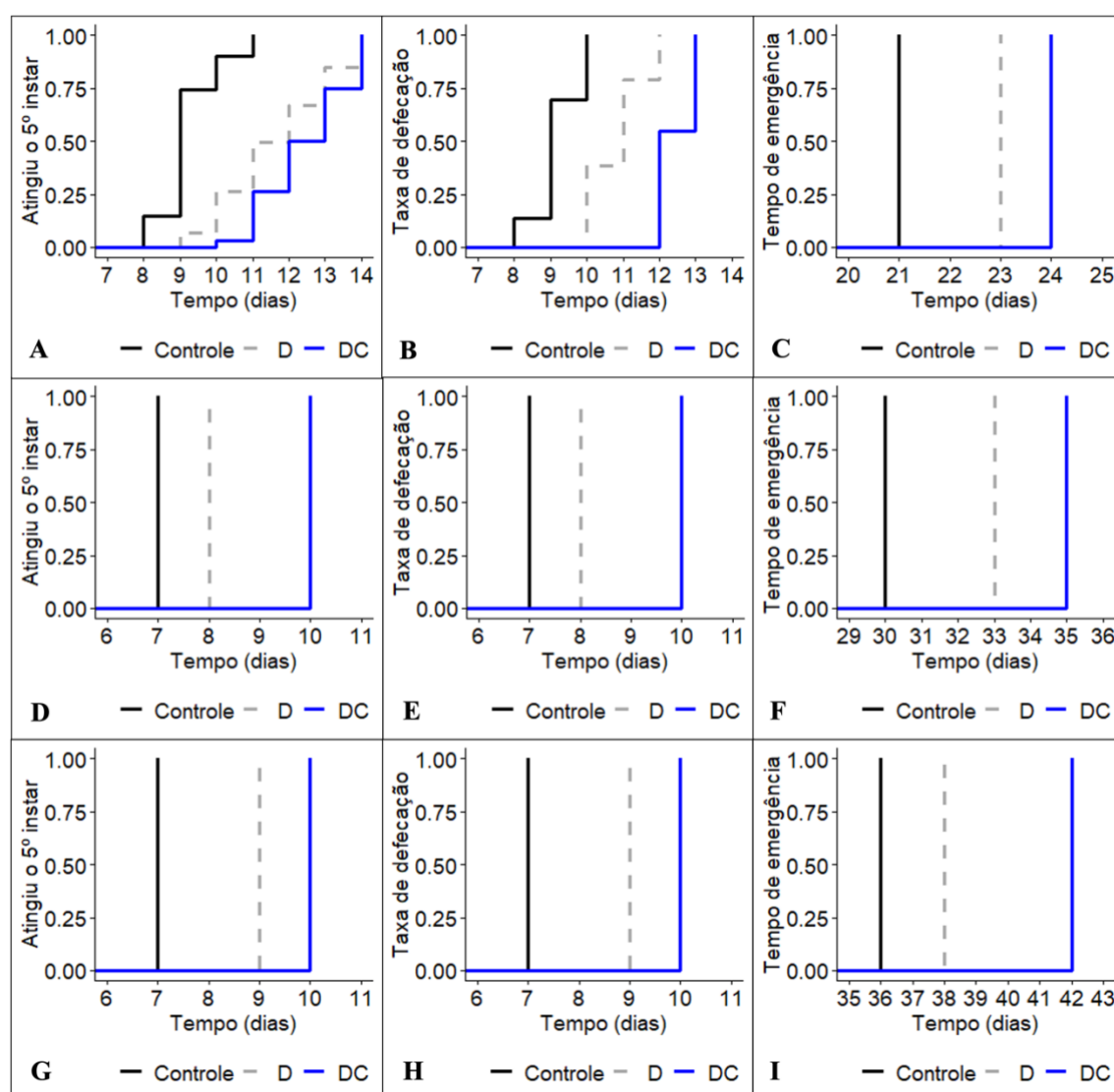
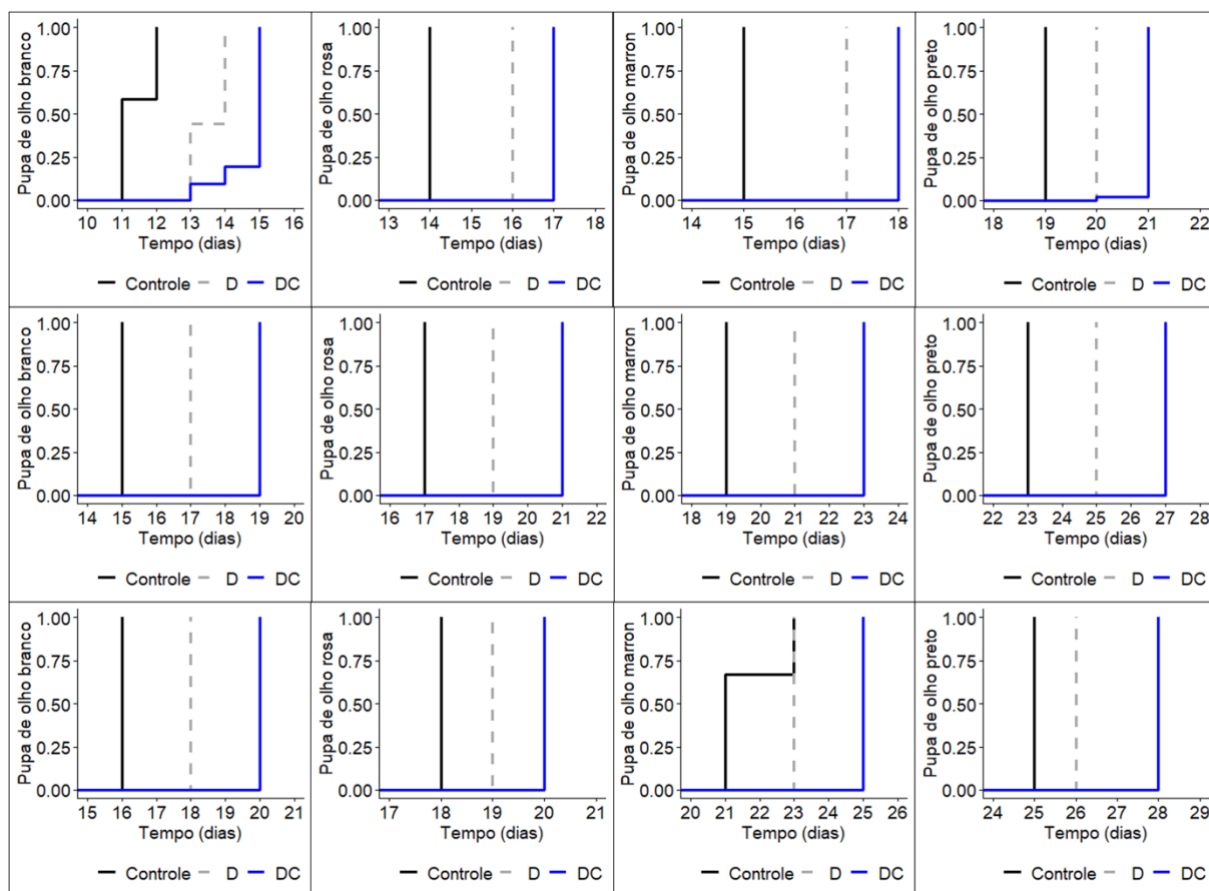


Figura 6: Tempo de coloração dos olhos: *Apis mellifera* - (A) atingiu olho branco; (B) atingiu olho rosa; (C) atingiu olho marrom (D) atingiu olho preto. *Melipona scutellaris* - (E) atingiu olho branco; (F) atingiu

olho rosa; (G) atingiu olho marrom (H) atingiu olho preto. *Scaptotrigona postica* - (I) atingiu olho branco; (J) Atingiu olho rosa; (K) Atingiu olho marrom (L) Atingiu olho preto.



Os grupos expostos demonstraram um atraso para atingir o 5^a instar larval e para taxa de defecação em comparação aos grupos controle. Os dados observados para esses parâmetros mostraram um atraso nos grupos expostos, uma vez que o controle começou o processo de defecação no D8, enquanto os grupos expostos começaram o processo nos dias D10 (D) e D12 (DC) para *Apis mellifera*; em *Melipona scutellaris*, o controle começou em D7 e os expostos nos dias D8 e D10; em *Scaptotrigona postica*, os indivíduos do controle defecaram no D7, e os expostos nos dias D9 e D10.

Os dados obtidos neste trabalho mostram também que os indivíduos dos grupos expostos sofreram um atraso em sua emergência para os dois grupos expostos e as três espécies estudadas, quando se comparado ao controle.

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os estudos em laboratório realizados por Tan et al (2017) e Al Naggar et al. (2019), pois demonstraram que a exposição ao FPF não apenas diminuiu a sobrevivência larval de abelhas, mas também reduziu a emergência de adultos, o que poderia ter uma reação em cadeia à adaptação da colônia.

A metamorfose é induzida e regulada por ecdisteróides e há uma probabilidade do sistema nervoso central (SNC) agir através de estímulos para promover a síntese de hormônios e assim desencadear o processo de muda (Cruz-Landim, 2009). Com isso, podemos presumir que, como o FPF tem um mecanismo de ação semelhante a inseticidas neonicotinóides, os atrasos no período de metamorfose podem ser decorrentes de um efeito do inseticida no SNC das larvas.

O hormônio juvenil (JH), juntamente com a 20-hidroxiecdisona (20E) desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e diferenciação de discos imaginais durante a metamorfose larval (Cruz-Landim, 2009). Segundo Chen e colaboradores (2016), qualquer distúrbio que possa desregular o equilíbrio desses hormônios durante o período de metamorfose pode causar respostas fisiológicas que culminam na malformação dos indivíduos.

De acordo com Li et al. (2021), o tiametoxam aumenta significativamente os níveis de hormônio juvenil 3 em larvas de abelhas, mostrando que esse aumento pode prejudicar o desenvolvimento por meio da alteração do curso regulatório da metamorfose. Hesselbach et al. (2019) mostraram que as abelhas tratadas com FPF iniciaram o forrageio mais cedo do que as abelhas do controle. Embora o FPF seja um inseticida neurotóxico, uma ação secundária pode desencadear distúrbios hormonais e, conseqüentemente, levar a essas alterações de comportamento.

O corpo gorduroso além de desempenhar um papel importante na desintoxicação, também armazena toxinas (Yu et al., 1984; Feng et al., 2018). Durante a metamorfose, o corpo gorduroso mobiliza reservas energéticas para suprir as necessidades metabólicas da pupa. Assim, os agrotóxicos absorvidos durante o desenvolvimento larval permanecem no organismo da abelha, sendo mobilizados pela hemolinfa durante a metamorfose, podendo ter seu efeito nos órgãos, quando ocorre a remodelação tecidual (Tadei et al., 2019). Esse armazenamento pode resultar em estresse contínuo para os indivíduos durante o desenvolvimento, diferentemente de abelhas adultas que realizam a excreção de resíduos tóxicos pela defecação regular (Zhu et al., 2014).

Santos e colaboradores (2016) observaram que as abelhas sem ferrão *Plebeia droryana*, quando expostas ao clorpirifós, demoraram de 1 a 2 vezes mais para se desenvolver quando comparadas ao controle. Tomé et al. (2020) também observaram um atraso no tempo total de desenvolvimento de larvas de abelhas expostas ao mesmo I.A (20 ng a.i./abelha).

O FPF tem impactos subletais significativos em abelhas (Siviter & Muth, 2019). Os resultados encontrados neste trabalho corroboram essa premissa. A utilização de doses recomendadas comercialmente neste estudo, reforça a importância e a necessidade de que os efeitos subletais provenientes de exposição oral ao FPF em larvas seja levado em consideração por autoridades regulatórias.

4. Conclusão

Diante dos resultados aqui apresentados, concluímos que os efeitos da exposição ao agrotóxico FPF, como redução da sobrevivência e atrasos no desenvolvimento, podem contribuir para o declínio da colônia ao longo do tempo. Podemos considerar que os resultados trazidos nesse estudo podem ser úteis no monitoramento das abelhas para elucidar a ação dos agrotóxicos sobre esses polinizadores, principalmente daqueles que são considerados seguros para polinizadores. Além disso, enfatizamos que espécies sem ferrão possam ser utilizadas como modelo experimental para avaliação de risco, contribuindo para a geração de informações adequadas para subsidiar estratégias de conservação dessas espécies.

5. Referências:

- AL NAGGAR, Yahya; BAER, Boris. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). Scientific reports, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- ARENA, M. & SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. Ecotoxicology 23, 324–334 (2014).
- AUPINEL, Pierrick et al. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. Bulletin of insectology, v. 58, n. 2, p. 107, 2005.
- AUPINEL, Pierrick et al. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, v. 63, n. 11, p. 1090-1094, 2007.
- BELL, Heather Christine et al. The novel butenolide pesticide flupyradifurone does not alter responsiveness to sucrose at either acute or chronic short-term field-realistic doses in the honey bee, *Apis mellifera*. Pest management science, v. 76, n. 1, p. 111-117, 2020.
- BPBES. Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos

no Brasil. [s.l: s.n.].

BRITO, Pedro et al. The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 31, p. 38654-38661, 2020.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. 2013.

CAMPBELL, Jacob B. et al. The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. *Journal of insect physiology*, v. 86, p. 11-16, 2016.

CAMPOS, A. L., ALVES IGNÁCIO, Á. R., OLIVEIRA, E. S. & LÁZARO, W. L. Pesticides in Brazil and their impacts on health and the environment. *Revista em Agronegocio e Meio Ambiente* 14, (2021).

CHAM, K. O. et al. Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. in *Environmental Entomology* 48, (2019).

CHEN, Yue-Wen et al. The impact of pyriproxyfen on the development of honey bee (*Apis mellifera* L.) colony in field. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v. 19, n. 3, p. 589-594, 2016.

CRALL, James D. et al. Neonicotinoid exposure disrupts bumblebee nest behavior, social networks, and thermoregulation. *Science*, v. 362, n. 6415, p. 683-686, 2018.

CRALL, James D. et al. Social buffering of pesticides in bumblebees: agent-based modeling of the effects of colony size and neonicotinoid exposure on behavior within nests. *Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 7, p. 51, 2019.

DA CRUZ LANDIM, Carminda. Abelhas. Unesp, 2009.

DAVID, Arthur et al. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. *Environment international*, v. 88, p. 169-178, 2016.

DECOURTYE, Axel; HENRY, Mickaël; DESNEUX, Nicolas. Overhaul pesticide testing on bees. *Nature*, v. 497, n. 7448, p. 188-188, 2013.

DORIGO, Adna et al. Biological data of stingless bees with potential application in pesticide risk assessments. *Sociobiology*, v. 65, n. 4, p. 777-779, 2018.

DORIGO, Adna Suelen et al. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PLoS One*, v. 14, n. 3, p. e0213109, 2019.

EFSA, GUIDANCE OF. EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). EFSA

Journal, v. 11, n. 7, p. 3295, 2013.

FELIX, J. A. & FREITAS, B. M. Richness and distribution of the meliponine fauna (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in the state of ceará, brazil. An. Acad. Bras. Cienc. 93, (2021).

FENG, Yuzheng et al. Mid-infrared spectroscopy study of effects of neonicotinoids on forager honey bee (*Apis mellifera*) fat bodies and their connection to colony collapse disorder. bioRxiv, p. 205112, 2018.

FORD, K. A. & CASIDA, J. E. Chloropyridinyl neonicotinoid insecticides: Diverse molecular substituents contribute to facile metabolism in mice. Chem. Res. Toxicol. 19, 944–951 (2006).

FORTUIN, Christine Cairns; MCCARTY, Elizabeth; GANDHI, Kamal JK. Acute contact with imidacloprid in soil affects the nesting and survival success of a solitary wild bee, *Osmia lignaria* (Hymenoptera: Megachilidae). Chemosphere, v. 264, p. 128572, 2021.

GIORIO, Chiara et al. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 1: new molecules, metabolism, fate, and transport. Environmental Science and Pollution Research, v. 28, n. 10, p. 11716–11748, 2021.

GLABERMAN, S.; WHITE, K. Environmental fate and ecological risk assessment for foliar, soil drench, and seed treatment uses of the new insecticide flupyradifurone (by 02960). US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division EFED, Environmental Risk Branch IV, v. 187, 2014.

GÓNGORA-GAMBOA, Cristian et al. Survival Rate of the Neotropical Stingless Bees *Nannotrigona perilampoides* and *Frieseomelitta nigra* after Exposure to Five Selected Insecticides, under Controlled Conditions. Insects, v. 13, n. 10, p. 961, 2022.

Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C. & Rotheray, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science (80-347), 1255957–1255957 (2015).

GOULSON, Dave. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. Journal of Applied Ecology, v. 50, n. 4, p. 977–987, 2013.

GOULSON, Dave; LYE, Gillian C.; DARVILL, Ben. Decline and conservation of bumble bees. Annu. Rev. Entomol., v. 53, p. 191–208, 2008.

HESSELBACH, Hannah et al. Chronic exposure to the pesticide flupyradifurone can lead

to premature onset of foraging in honeybees *Apis mellifera*. *Journal of Applied Ecology*, v. 57, n. 3, p. 609-618, 2020.

HESSELBACH, Hannah; SCHEINER, Ricarda. Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

HESSELBACH, Hannah; SCHEINER, Ricarda. The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. *Ecotoxicology*, v. 28, n. 3, p. 354-366, 2019.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia et al. Bees as pollinators in Brazil. Ribeirão Preto, Holos Editora, 2006.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; NUNES-SILVA, Patrícia. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 59-62, 2010.

IPBES, Summary for policymakers of the global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, S. Díaz, et al., Eds. (IPBES secretariat, 2019) (August 15, 2019).

IPBES. 2016. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Potts SG et al., eds. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany.

JAFFÉ, R. et al. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. *PLoS One* 10, (2015).

JESCHKE, Peter et al. Flupyradifurone (Sivanto™) and its novel butenolide pharmacophore: Structural considerations☆. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 121, p. 31-38, 2015.

JESCHKE, Peter; NAUEN, Ralf. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, v. 64, n. 11, p. 1084-1098, 2008.

KASSAMBARA, Alboukadel et al. RNA-sequencing data-driven dissection of human plasma cell differentiation reveals new potential transcription regulators. *Leukemia*, v. 35, n. 5, p. 1451-1462, 2021.

KERR, Warwick Estevam; ZILSE, Gislene Almeida Carvalho; NASCIMENTO, Vania Alves. *Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação*. 1996.

KESSLER, Sébastien C. et al. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature*, v. 521, n. 7550, p. 74-76, 2015.

KOK, M. T. J. et al. Biodiversity and ecosystem services require IPBES to take novel approach to scenarios. *Sustainability Science* 12, (2017).

LI, Sheng; YU, Xiaoqiang; FENG, Qili. Fat body biology in the last decade. *Annual Review of Entomology*, [S. l.], v. 64, n. January 2021, p. 315–333, 2019. a. DOI: 10.1146/annurev-ento-011118-112007.

LIPPERT, Christian; FEUERBACHER, Arndt; NARJES, Manuel. Revisiting the economic valuation of agricultural losses due to large-scale changes in pollinator populations. *Ecological Economics*, v. 180, p. 106860, 2021.

MACIEIRA, Oilton José Dias; PRONI, Edson Aparecido. Capacidade de resistência a altas e baixas temperaturas em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille)(Hymenoptera, Apidae) durante os períodos de verão e inverno. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, p. 893-896, 2004.

MARTINS, Aline C.; MELO, Gabriel AR. Has the bumblebee *Bombus bellicosus* gone extinct in the northern portion of its distribution range in Brazil?. *Journal of Insect Conservation*, v. 14, n. 2, p. 207-210, 2010.

MENEZES, C., VOLLET-NETO, A., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.I., 2013. An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. *Apidologie* 5, 491e500. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0197-6>.

MICHENER, C. D. The bees of the world, 2nd edition. *Johns Hopkins Univ. Press* (2007).

MORAL, R.A., HINDE J., DEMÉTRIO, C.G.B. “Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package.” *Journal of Statistical Software*, *81*(10), 1-23, 2017.

NAUEN, Ralf et al. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest management science*, v. 71, n. 6, p. 850-862, 2015.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. 1997.

OECD (2013), Test No. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203723-en>.

PAUMGARTTEN, F. J. R. Pesticides and public health in Brazil. *Current Opinion in Toxicology* 22, (2020).

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 61, 348–354 (2014).

PELAEZ, V., TERRA, F. H. B. & SILVA, L. R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente *Agrochemical*

regulation in Brazil: market power vs. health and environment defense. *Rev. Econ.* 36, 27–48 (2010).

PIGOZZO, Camila Magalhães; VIANA, Blandina Felipe. Estrutura da rede de interações entre flores e abelhas em ambiente de caatinga. *Oecologia Australis*, v. 14, n. 1, p. 100-114, 2010.

PIRES, C. S. S., TOREZANI, K. D. S., CHAM, K. O., VIANA-SILVA, F. E. C., BORGES, L. O., TONELLI, C. A. M., ... & CIONE, A. P. (2018). Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos. *Brasília: Ibama*.

PISA, Lennard et al. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 10, p. 11749-11797, 2021.

POTTS, Robert et al. The effect of dietary neonicotinoid pesticides on non-flight thermogenesis in worker bumble bees (*Bombus terrestris*). *Journal of insect physiology*, v. 104, p. 33-39, 2018.

POTTS, S. G. et al. Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 25, 345–353 (2010).

RATTO, F. et al. Pollination Services. Toolkit Ecosyst. Serv. Site-based Assess. (TESSA). Version 2.0 284, 282–284 (2017).

REILLY, J. R. et al. Crop production in the USA is frequently limited by a lack of pollinators. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 287, n. 1931, p. 20200922, 2020.

RORTAIS, Agnès et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. *Apidologie*, v. 36, n. 1, p. 71-83, 2005.

ROSA, Annelise de Souza et al. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. *Apidologie*, v. 47, n. 6, p. 729-738, 2016.

ROSA-FONTANA, Annelise et al. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. *Environmental Pollution*, v. 265, p. 114849, 2020.

RUEPPELL, Olav; HAYWORTH, Miranda K.; ROSS, N. P. Altruistic self-removal of health-compromised honey bee workers from their hive. *Journal of evolutionary biology*, v. 23, n. 7, p. 1538-1546, 2010.

SÁNCHEZ-BAYO, Francisco. The trouble with neonicotinoids. *Science*, v. 346, n. 6211, p. 806-807, 2014..

DOS SANTOS, Charles F. et al. Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.

SILVA, Carina Aparecida de Souza. Análise dos efeitos do fipronil e dimetoato em larvas e pupas de *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) africanizada criadas em condições laboratoriais. 2014.

SIMON-DELSO, Noa et al. The challenges of predicting pesticide exposure of honey bees at landscape level. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

SIVITER, Harry; MUTH, Felicity. Do novel insecticides pose a threat to beneficial insects?. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 287, n. 1935, p. 20201265, 2020.

SLAA, Ester Judith et al. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, v. 37, n. 2, p. 293-315, 2006.

SOARES PIRES, Carmen Silvia et al. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: are there cases of CCD?. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, p. 422-442, 2016.

SUCHAIL, S., GUEZ, D. & BELZUNCES, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2482–2486 (2001).

TADEI, Rafaela et al. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

TAN, Ken et al. The pesticide flupyradifurone impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.

TAVARES, Daiana Antonia et al. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, v. 135, p. 370-378, 2015.

TERRY, M., THERNEAU, P. M. Grambsch. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. Springer, New York. ISBN 0-387-98784-3, 2000.

THERNEAU, T. A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.3-1, <https://CRAN.R-project.org/package=survival>, 2022.

TOMÉ, Hudson Vaner V. et al. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PloS one*, v. 7, n. 6, p. e38406, 2012.

TOME, Hudson VV et al. Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. *Environmental Pollution*, v. 256, p. 113420, 2020.

TOSI, Simone et al. A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides. *Science of the total environment*, v. 615, p. 208-218, 2018.

TOSI, Simone et al. Effects of a neonicotinoid pesticide on thermoregulation of African honey bees (*Apis mellifera* scutellata). *Journal of Insect Physiology*, v. 93, p. 56-63, 2016.

TOSI, Simone et al. Long-term field-realistic exposure to a next-generation pesticide, flupyradifurone, impairs honey bee behaviour and survival. *Communications biology*, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2021.

TOSI, Simone et al. Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 284, n. 1869, p. 20171711, 2017.

TOSI, Simone; BURGIO, Giovanni; NIEH, James C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

TOSI, Simone; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

TOSI, Simone; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 286, n. 1900, p. 20190433, 2019.

WILLIS CHAN, D. Susan; RAINE, Nigel E. Population decline in a ground-nesting solitary squash bee (*Eucera pruinosa*) following exposure to a neonicotinoid insecticide treated crop (*Cucurbita pepo*). *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2021.

WOLOWSKI, M. et al. Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil. Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção Aliment. no Bras. (2019). doi:10.4322/978-85-60064-83-0

WU, Judy Y.; ANELLI, Carol M.; SHEPPARD, Walter S. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PloS one*, v. 6, n. 2, p. e14720, 2011.

YANG, E.-C., CHANG, H.-C., WU, W.-Y. & CHEN, Y.-W. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLOS ONE* 7, e49472 (2012).

YU, S. J.; ROBINSON, F. A.; NATION, J. L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 22, n. 3, p. 360-368, 1984.

ZHU, Wanyi et al. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in

the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. PloS one, v. 9, n. 1, p. e77547, 2014.

Capítulo 2

O artigo referente a este capítulo será submetido para publicação na *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Ação enzimática em larvas de abelhas melíferas e sem ferrão (Hymenoptera, Apidae) em resposta à exposição ao inseticida Flupiradifurona

DORIGO, A.S.¹, ROSA-FONTANA A.S.¹, GRELLA, T.C¹, NOCELLI, R.C.F.², MALASPINA, O.¹

¹ Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-SP), Rio Claro, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-SP), Araras, SP, Brasil.

1. Introdução:

A polinização é indispensável para a perpetuação das espécies vegetais e para produção de alimentos de importância econômica mundial (Potts et al., 2016). Caso não ocorra polinização das angiospermas, haverá uma perda ou diminuição da variabilidade genética, aumento no número de frutos com má formação, diminuição da produção agrícola e, por consequência, a forte relação entre planta e polinizador pode causar a extinção de toda uma população de abelhas. Isso acaba atingindo também a fauna dependente de seus produtos, gerando desequilíbrio ecológico, alterações no solo e nos regimes de águas (Nocelli et al, 2012; Kerr et al, 2001; Kevan, 2002).

O Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil. - BPBES (2019), indicou que 75% da alimentação humana depende direta ou indiretamente de plantas polinizadas por agentes bióticos, principalmente abelhas.

As abelhas são, entre os insetos, um dos grupos mais estudados, cujos trabalhos publicados abarcam uma vasta gama das subáreas das ciências biológicas. As abelhas formam um grupo monofilético, compartilham um ancestral comum com as vespas (Roubik, 2006; Johnson et al., 2013), pertencem à classe Insecta e estão inseridas na ordem Hymenoptera (Nogueira-Neto, 1997; Silva, 2006). Estima-se que existam mais de

quatro mil gêneros e cerca de 20 mil espécies de abelhas distribuídas nas diferentes regiões do mundo (Michener, 2013; Silva et al, 2014). O Brasil, devido às suas proporções continentais e riqueza de ecossistemas, pode ser considerado privilegiado neste aspecto, por abrigar, aproximadamente, 5.000 destas espécies distribuídas em cinco famílias (Silva et al, 2014).

As abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) formam o maior grupo de abelhas eussociais do mundo e vivem em colônias perenes que podem variar de dezenas a milhares de indivíduos (Michener 2013). Atualmente no Brasil se tem a ocorrência de cerca de 244 espécies de abelhas sem ferrão, sendo que algumas delas estão em risco de extinção (De Menezes Pedro, 2014).

As abelhas da tribo Meliponini são também conhecidas como abelhas sem ferrão, pelo fato de possuírem ferrão atrofiado. Elas costumam nidificar em troncos ocos, galhos de árvores, buracos no chão, cupinzeiros abandonados e em ninhos de outros animais. Atualmente é comum encontrar ninhos em buracos derivados de construções, neste caso, muros, postes, paredes etc. (Silveira; Melo; Almeida, 2002).

Uruçu ou urucu nordestina são nomes populares dados à espécie *Melipona scutellaris* Latreille, 1811, natural do nordeste do Brasil (Nogueira-Neto, 1997). Esta abelha tem a capacidade de realizar a polinização por vibração, ato que consiste em vibrar a musculatura torácica para agitar as anteras, o que possibilita a saída do pólen. Esse tipo de polinização é essencial para plantas com anteras poricidas, onde o pólen apenas é liberado por poros apicais (Nunes-Silva & Imperatriz-Fonseca, 2010). Essa espécie está, atualmente, incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção.

A *Scaptotrigona postica* é nativa do Brasil e é conhecida localmente como mandaguari. Esta abelha sem ferrão tem distribuição climática tropical e subtropical, e tem sido observada na maior parte da América Latina. (Nogueira-Neto, 1997). Apesar do reconhecimento do papel essencial das abelhas nos ecossistemas naturais e agrícolas, tem sido verificado um declínio global de populações de abelhas. Várias são as causas atribuídas, dentre elas as mudanças climáticas, a fragmentação de habitats a ocorrência de doenças e especialmente o uso excessivo e incorreto de agrotóxicos em agroecossistemas (Kremen et al., 2002; Pettis et al., 2013; Suryanarayanan & Kleinman, 2013; Sanchez-Bayo & Goka, 2014; Kerr et al., 2015; Broeckx et al., 2019; Suppa et al., 2020; de Oliveira et al., 2020; Masood et al., 2021; Mesnage et al., 2021; Pinto et al., 2021).

Em paisagens agrícolas, as abelhas estão expostas a muitas classes de agrotóxicos, alguns dos quais podem exercer efeitos diretos sobre a mortalidade e outros que podem provocar efeitos subletais que prejudicam importantes vias fisiológicas (Johnson et al., 2015). Talvez o exemplo mais bem estudado sejam os neonicotinoides. Desde sua introdução, há 30 anos, os inseticidas neonicotinoides têm recebido maior escrutínio por seus efeitos subletais sobre os polinizadores do que outras classes de inseticidas, provavelmente devido à sua rápida e ampla adoção pelos produtores e sua capacidade de ser absorvido pelas plantas sistematicamente. Os neonicotinoides podem persistir nos tecidos vegetais e no ambiente circundante (Cullen et al., 2019; Mogren et al., 2016), expondo organismos fora do alvo a doses subletais crônicas. Em um esforço para proteger os polinizadores, vários neonicotinoides e outros agrotóxicos foram banidos ou restringidos em algumas regiões ou países (Stokstad et al., 2018; Dupraz-Dobias et al., 2018).

Tem havido um esforço nos últimos anos para desenvolver novos produtos químicos que sejam mais seguros para as abelhas e outros polinizadores. Um desses agrotóxicos é o flupiradifurona (FPF), um novo tipo de inseticida butenolídeo divulgado como seguro para as abelhas (Bayer Crop Science, 2022). O FPF é um inseticida sistêmico que, como os neonicotinoides, tem como alvo os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no sistema nervoso (Nauen et al., 2015).

O FPF demonstrou ter toxicidade sazonal para as abelhas, onde algumas abelhas são mais sensíveis ao FPF no verão do que no início da primavera (Tosi et al., 2019). Segundo Tosi et al. (2021) o FPF, prejudica a sobrevivência e o comportamento das abelhas em doses realistas de campo.

Um problema reportado no Brasil é a mortalidade em massa de abelhas, onde apicultores encontram, muito próximo de suas colmeias, um expressivo número de operárias mortas que, muitas vezes, leva à perda total da colônia. Os registros dessas ocorrências são do híbrido da espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apoidea) encontrado no Brasil, mas criadores de abelhas sem ferrão (meliponicultores), também têm registrado o problema. A mortalidade massiva e repentina das abelhas tem sido atribuída, em 80% dos casos, ao uso incorreto de agrotóxicos (MAP 2016).

Segundo Pires et al. (2016), o problema registrado no Brasil é diferente do que vem sendo registrado no hemisfério norte, chamado de “Collony Collapse Disorder” ou simplesmente CCD. No Brasil ocorrem casos de enfraquecimento e declínio que têm sido registrados em vários estados brasileiros e somam grandes perdas, e os resultados das

ocorrências analisadas nesse mesmo trabalho indicaram que as mortalidades em massa registradas no Brasil não estavam associadas a patógenos ou a parasitas.

Os dados sobre toxicidade de agrotóxicos para abelhas foram produzidos principalmente com a utilização da espécie *A. mellifera*, pois ela se difundiu por todo o mundo e conta com uma bem-sucedida tecnologia de criação e manejo, que possibilita sua criação em larga escala e o transporte seguro de uma colmeia padrão às áreas agrícolas (Imperatriz-Fonseca, 2004). Avanços recentes na literatura científica fornecem várias investigações sobre os efeitos dos agrotóxicos nas abelhas sem ferrão (Costa et al., 2015; Silva et al., 2016; Bernardes et al., 2018; Boff et al., 2018; Moreira et al., 2018; Ravaiano et al., 2018 ; Seide et al., 2018; Otesbelgue et al., 2018; Morais et al., 2018; Jacob et al., 2019 a; Jacob et al., 2019 b), porém continuam em sua maioria sendo com indivíduos adultos.

Poucos trabalhos abordaram o estágio larval de abelhas sem ferrão no Brasil (Menezes et al., 2014; Menezes et al., 2015; Rosa et al., 2015; Rosa et al., 2016; Paludo et al., 2018; Dorigo et al., 2018; Dorigo et al., 2019; Rosa-Fontana et al., 2020). Os dois últimos são os únicos trabalhos que possuem uma abordagem de padronização de um método para estabelecer um protocolo para criação dessas abelhas sem ferrão. Essa padronização é de extrema importância para que os bioensaios de toxicidade possam ser executados da mesma forma em qualquer lugar. Com isso se obtém uma maior homogeneidade nos resultados, aumentando a confiabilidade dos dados obtidos. O período pós-embrionário pode ser considerado uma fase crucial, no qual danos decorrentes de exposição aos agrotóxicos podem causar danos irreversíveis aos indivíduos, ou mesmo à colônia.

As formas de avaliação de toxicidade para abelhas e outros organismos não-alvo de agrotóxicos incluem a determinação das doses e concentrações letais médias, que matam 50% de uma população. No entanto, os potenciais efeitos subletais e/ou de doses de campo devem ser considerados e investigados. Desneux et al. (2007), em seu trabalho de revisão, afirma que doses subletais podem comprometer muitos processos biológicos, a exemplo do comportamento de voo, desenvolvimento das larvas, tempo de vida, e inibição de enzimas.

As enzimas de desintoxicação têm sido um mecanismo molecular bastante discutido em relação aos inseticidas no Brasil, pois as mesmas têm a capacidade de degradar substâncias potencialmente tóxicas em substâncias menos tóxicas ou inertes, sendo mais fáceis de serem excretadas. Estas enzimas são apontadas como importantes marcadores

para avaliação da exposição à agrotóxicos em abelhas (Badiou; Meled; Belzunces, 2008; Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Barbosa, 2015; Tavares et al., 2017; Soares-Lima, 2017; Decio, 2019).

Processos de biotransformação realizados por uma série de enzimas são a base para a desintoxicação de organismos expostos a agrotóxicos (Johnson, 2015). Esse processo é classificado em reações divididas em duas fases principais: Fase I (Pré-sintética) e Fase II (Sintética ou conjugação). A Fase I é responsável pela oxidação, redução e hidrólise de substâncias que alteram sua estrutura química pela adição de grupos funcionais como -OH, -NH₂, -SH ou -COOH.

Enzimas, como a acetilcolinesterase (AChE); carboxilesterase (CaE-3), glutathione-S-transferase (GST); glutathione peroxidase (GP); glutathione reductase (GR); fosfatase alcalina (PAL), glicose oxidase (GOX), fenol oxidase (POX); e glicose-6-fosfato (G6PDH) podem desempenhar diferentes papéis nas abelhas, como atuar no sistema nervoso, metabolismo, desintoxicação e estresse oxidativo (Berenbaum & Johnson, 2015; Gong & Diao, 2017). Alterações na atividade desses biomarcadores são ferramentas importantes para avaliar o estado fisiológico após a exposição a agrotóxicos (Hyne & Maher, 2003).

O sistema enzimático das abelhas pode apresentar diferentes respostas frente à exposição aos agrotóxicos, tais como butenolídeos. Por estar relacionada com a metabolização dos agrotóxicos, a resposta enzimática é fundamental para a compreensão dos mecanismos que envolvem este processo, como também na habilidade do organismo se adaptar a estressores ambientais (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Gilbert; Wilkinson, 1975; Jokanovic et al., 2001; Yu et al., 1984).

A sensibilidade das abelhas aos inseticidas poderia estar diretamente ligada ao déficit dessas enzimas de desintoxicação, pois nesses casos, as abelhas apresentam uma deficiência nos genes que estão diretamente associados à aquisição de resistência aos produtos químicos (Claudianos et al., 2006). Diante disso, presume-se que as abelhas não possam adquirir resistência aos produtos aplicados nas áreas de cultivo, como ocorre com as pragas-alvo, o que poderia trazer graves consequências para populações de abelhas.

Nesse sentido, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e outros pesquisadores ressaltam a necessidade de estudos ecotoxicológicos que utilizem diferentes abordagens, como avaliar o perfil de atividade enzimática para abelhas não-Apis (Boyle et al., 2019; Cham et al., 2019; IBAMA, 2017).

Dessa forma, se torna importante averiguar a atividade de enzimas relacionados aos processos de desintoxicação após a exposição a agrotóxicos.

Sendo assim, o presente estudo tem por objetivo expor abelhas das espécies *M. scutellaris*, *S. postica* e *A. mellifera* ao agrotóxico flupiradifurona (FPF), via alimentação, durante o seu estágio larval, a concentrações realistas de campo, por meio da atividade enzimática a fim de verificar possíveis efeitos tóxicos.

2. Materiais e Métodos:

Coleta do material biológico para bioensaios in vitro

Favos com larvas das espécies *A. mellifera*, *M. scutellaris* e *S. postica* foram coletados de colônias não parentais do apiário e meliponário do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro. Para as coletas foram selecionadas três colônias fortes, estabelecidas com base no número de indivíduos e rainha jovem. A coleta foi realizada respeitando intervalos de 40 dias para a recuperação e desenvolvimento de novas operárias, de modo que não prejudicasse sanidade das colônias. Dessa forma, foram coletados favos contendo ovos, utilizados para extrair o alimento larval e favos contendo larvas de primeiro instar (recém-eclodidas), utilizados nos bioensaios de criação in vitro.

Obtenção das concentrações realistas de campo para o Flupiradifurona

O ingrediente ativo utilizado nos bioensaios foi a Flupiradifurona PESTANAL® ($C_{12}H_{11}Cl F_2N_2O_2$), padrão analítico Sigma-Aldrich, pureza $\geq 98,0\%$, lote: BCCB1463. Para os bioensaios, foram utilizadas concentrações realistas de campo, considerando o pior cenário de aplicação. Para os cálculos foram utilizadas como base as culturas de café, tomate e citros.

Para obter essa concentração realística de campo, foi utilizado o perfil ambiental do ingrediente ativo Flupiradifurona, publicado pelo IBAMA em 2019, que tem como base a bula do produto formulado disponível no mercado. Outra ferramenta também utilizada foi o BeeRex, desenvolvido pela US-EPA (United States Environmental Protection Agency), o qual foi incorporado para uso nas avaliações de risco pelo IBAMA.

Com base nos cálculos para obtenção da dose realística de campo, foi encontrada a concentração/dose de 7,7 ng/ μ L (DC) de alimento larval. Foi utilizado nos bioensaios também a concentração/dose de 0,77 ng/ μ L (D), que corresponde a concentração

realística de campo dividida 10 vezes. É importante salientar que tal ingrediente ativo é considerado como risco ambiental: III - Produto perigoso, conforme informações do perfil ambiental do produto (IBAMA, 2019).

Bioensaio in vitro com *Apis mellifera*

Para os bioensaios foram utilizados os protocolos para desenvolvimento larval descritos por Aupinel et al., (2003, 2005), que são a base para a normativa OECD 237, com adaptações feitas por Dorigo et al. (2015).

Todo o procedimento está descrito no capítulo 1.

Bioensaio in vitro com espécies sem ferrão: *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica*

Para os bioensaios foram utilizados os protocolos para desenvolvimento larval descritos em Dorigo et al. (2019) e Rosa-Fontana et al. (2020).

Todo o procedimento está descrito no capítulo 1.

Análises estatísticas

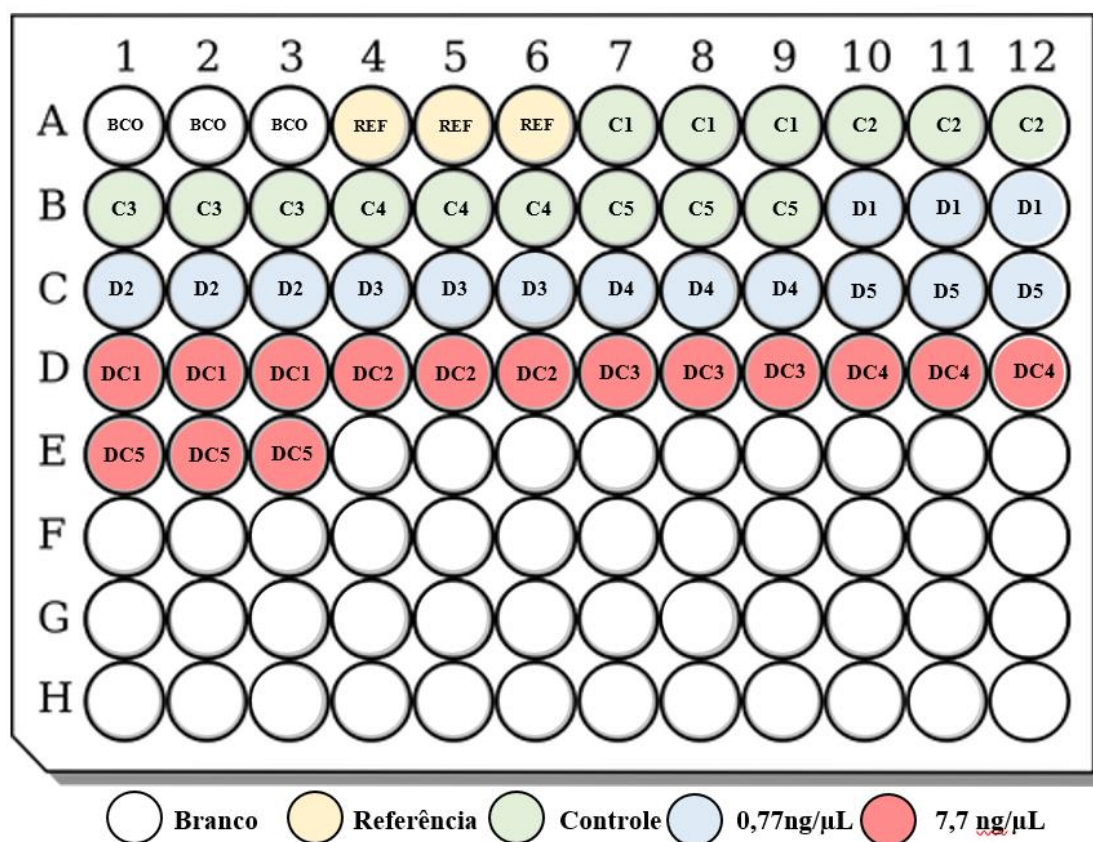
Os dados originais ou transformados pelo método de Box-Cox (1964) não atenderam as pressuposições do modelo da análise de variância (normalidade e homogeneidade). Dessa forma, fez-se uso do teste de comparação das medianas. O procedimento utilizado consiste em um teste não paramétrico para múltiplas amostras independentes. Em resumo, o teste da mediana, que é disponibilizado pela função `median.test` do pacote “*agricolae*” (Mendiburu et al., 2019) do programa R (R Core Team, 2021) é projetado para examinar se várias amostras vieram de populações com a mesma mediana.

Análise das atividades enzimáticas

As larvas foram expostas a concentração de campo e concentração de campo/10 (7,7 ng FPF/ μ L e 0,77 ng FPF/ μ L) e foram coletadas após 48 horas do término da alimentação larval. Foram coletados 15 indivíduos de cada grupo experimental, alocados em 5 tubos plásticos, sendo que cada tubo continha 3 larvas das espécies *A. mellifera*, *S. postica* e *M. scutellaris*, das quais a atividade das enzimas AChE, G6PDH, CaEs *p*, GST, GR, GP, GOX, POX e PAL foi analisada.

As amostras foram maceradas e centrifugadas em solução de extração, cuja quantidade foi previamente calculada de acordo com o peso de cada amostra. Para extração, um tampão feito de cloreto de sódio 10 mM, 1% (p/v), Triton X-100, fosfato de sódio 40 mM pH 7,4 e inibidores de protease contendo as larvas (2 µg /mL de pepstatina A, leupitina e apropitina, em cada microtubo foram colocados 0,1 mg/mL de inibidor de tripsina de soja e 25 unidades/mL de antidor, para fazer 10% (p/v) de extrato. A homogeneização foi realizada com o auxílio de um disruptor de células e tecidos L-Beater 6 Loccus® por 2 ciclos. Cada ciclo homogeneizou as amostras por agitação automática a uma velocidade de 2.500 rpm, 5 agitações com intervalos de 10s. As amostras foram centrifugadas a 4 °C por 20 min a 15.000 x gav e o sobrenadante foi coletado e armazenado em gelo para análise. A microplaca de 96 poços foi montada a partir de 5 réplicas de cada grupo, sendo que cada réplica possuía sua triplicata (Figura 1), totalizando 15 poços da placa para cada grupo analisado.

Figura 1: Esquema representativo da placa Elisa de 96 poços com os respectivos substratos.



Após a montagem da placa com o meio extraído das larvas, foi colocado o meio reacional para analisar a atividade de cada enzima. Todo o processo de extração foi realizado a 4° C.

Cada meio reacional foi preparado da seguinte forma:

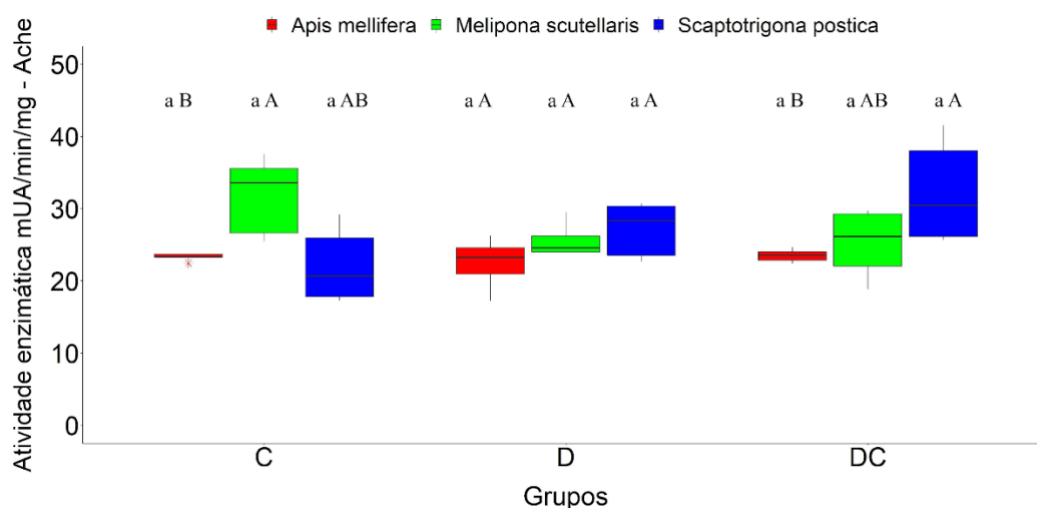
- AChE foi avaliada a 412 nm em um meio contendo extrato de tecido, DTNB 1,5 mM, AcSCh 0,3 mM como substrato e fosfato de sódio 100 mM pH 7,0.
- CaE-3 foi testada em um meio contendo o extrato de tecido, 10 µM BW284C51 (inibidor de acetilcolinesterase), 0,1 mM de p-NPA como substrato e 100 mM de fosfato de sódio pH 7,0 e a reação foi monitorada a 410 nm.
- GST foi determinada medindo a conjugação de GSH com 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) a 340 nm. O meio reacional continha EDTA 1 mM, CDBN 2,5 mM e fosfato na/k 100 mM pH 7,4.
- GP foi testada usando hidroperóxido de terc-butil (TBHP) como substrato. O GSSG gerado foi reduzido pela glutathione redutase (GR) na presença de NADPH para gerar GSH e NADP. A conversão de NADPH em NADP⁺ foi seguida a 340 nm. O meio reacional continha EDTA 1 mM, TBHP 0,2 mM, GSSG 0,85 mM, NADPH 0,16 mM, GR 0,25 U/mL e fosfato na/K 50 mM pH 7,4.
- GR foi avaliada a 340 nm pela conversão de NADPH em NADP⁺. O meio reacional continha EDTA 1 mM, GSSG 0,85 mM, NADPH 0,16 mM e fosfato Na/K 50 mM pH 7,4.
- G6PDH foi medida pela formação de NADPH a 340 nm nos extratos, 1 mM G6P como substrato, 0,5 mM NADP⁺ como coenzima, 10 mM MgCl₂ e 100 mM Tris-HCL pH 7,4.
- PAL foi avaliada a 410nm com 10µL de extrato de tecido com 20 µM de MgCl₂, 2 mM de p-nitrofenil fosfato como substrato e 100 mM de tampão tris-HCL pH 8,5.
- GOX foi avaliada a 430nm com de 10µL de extrato de tecido com 125 mM de tampão KH₂PO₄ a pH7, 100 mM de glucose, 2,5U/200µL de peroxidase e 0,3 mM de O-dianisidine.
- POX foi avaliada a 490nm com de 50µL de extrato de tecido com 10 mM de tampão NaH₂PO₄, 20 mM de NaCl a pH 7,2 e 0,4 mg/mL de L-dopa.

As leituras foram realizadas em placas de cultura de células de 96 poços usando um leitor de microplacas espectrofotômetro (Molecular Devices) a 25°C por 5 minutos.

3. Resultados

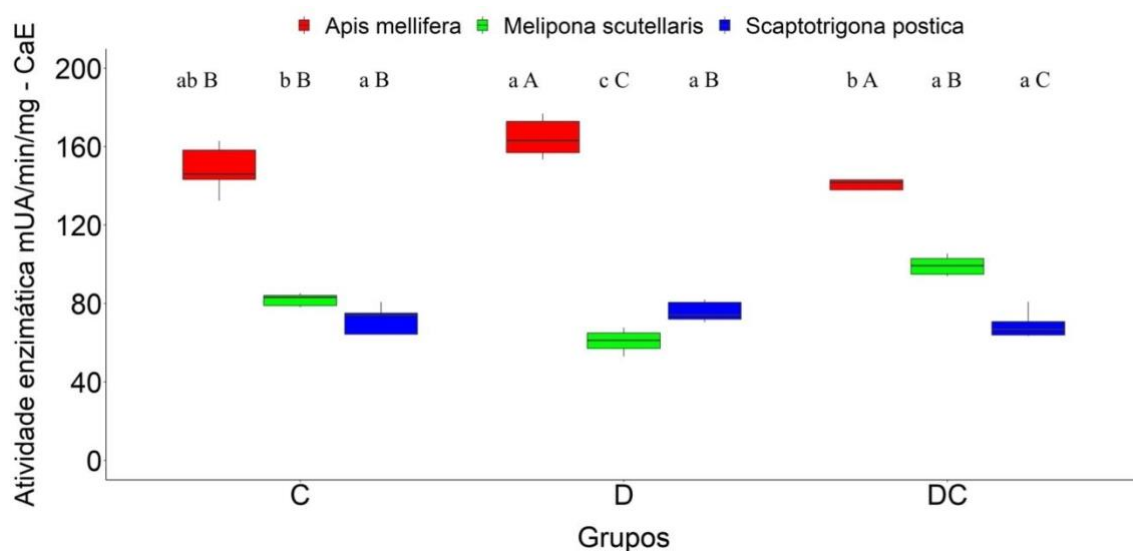
A partir das análises realizadas, foi observado que a atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) para as espécies *A. mellifera*, *S. postica* e *M. scutellaris* não apresentou diferença estatística entre o controle e os demais grupos. Porém, houve diferença estatística dentro do grupo DC entre as espécies *A. mellifera* e *S. postica* e houve um aumento da expressão dessa enzima quando se observa a espécie sem ferrão. Dentro do grupo controle temos uma diferença entre a atividade enzimática da espécie *A. mellifera* com a *M. scutellaris*, a qual expressou maior atividade do que a abelha exótica.

Figura 2: Boxplot mostrando a atividade enzimática da Acetilcolinesterase (AChE). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (DC) (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (D) (0,77 ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



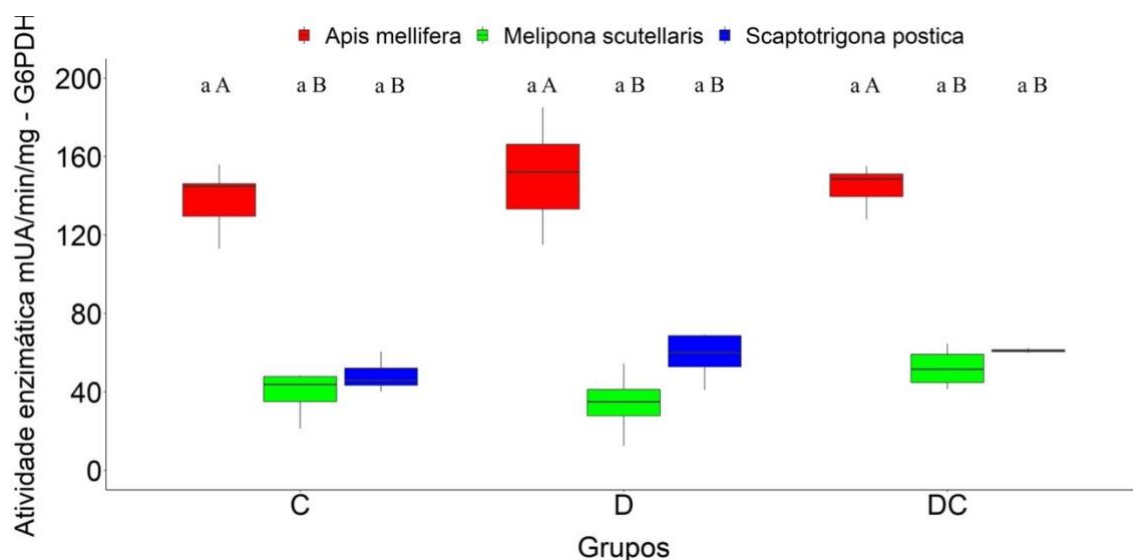
Para a enzima CaE, houve diferença estatística entre os grupos para a espécie *M. scutellaris*, havendo um aumento da atividade enzimática quando se compara o controle com os dois grupos existentes. Houve também diferença estatística quando se compara as espécies dentro dos grupos, pois se observou uma expressão mais alta da enzima para a espécie *A. mellifera* quando comparada a espécie *M. scutellaris* e *S. postica*. Foi observada também uma diferença estatística entre as espécies *M. scutellaris* e *S. postica* na comparação dentro dos grupos (Figura 3).

Figura 3: Boxplot mostrando a atividade enzimática da Carboxilesterase (CaE). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (0,77ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



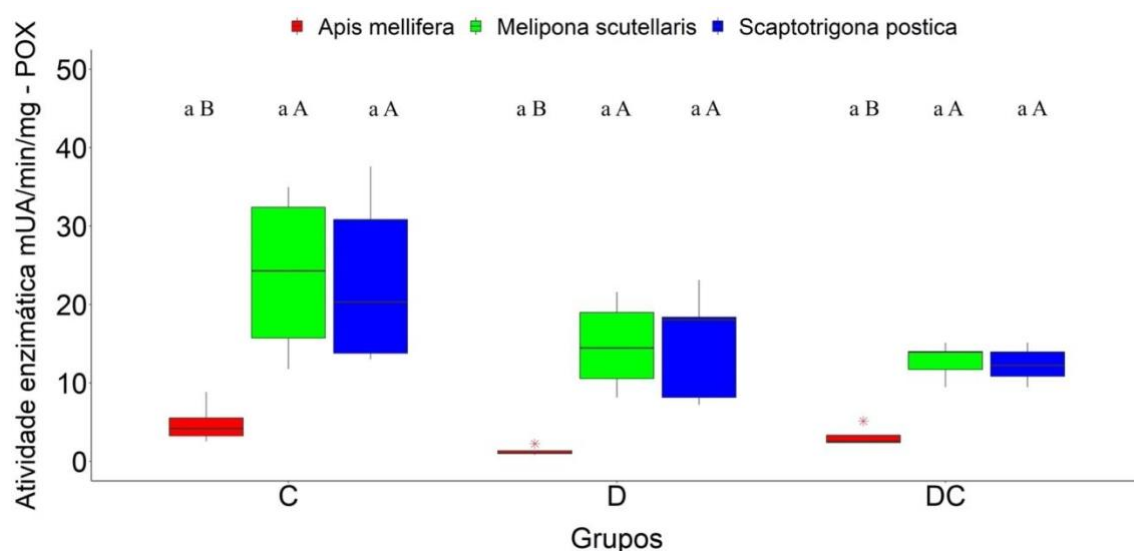
Na enzima G6PDH foi observado que a atividade enzimática para as espécies *A. mellifera*, *S. postica* e *M. scutellaris* não apresentou diferença estatística entre o controle e os grupos D e DC. Porém houve diferença estatística dentro de todos os grupos quando se compara *A. mellifera* com as outras espécies, pois houve uma diminuição da atividade enzimática nas abelhas sem ferrão (Figura 4).

Figura 4: Boxplot mostrando a atividade enzimática da glicose-6-fosfato (G6PDH). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (0,77ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



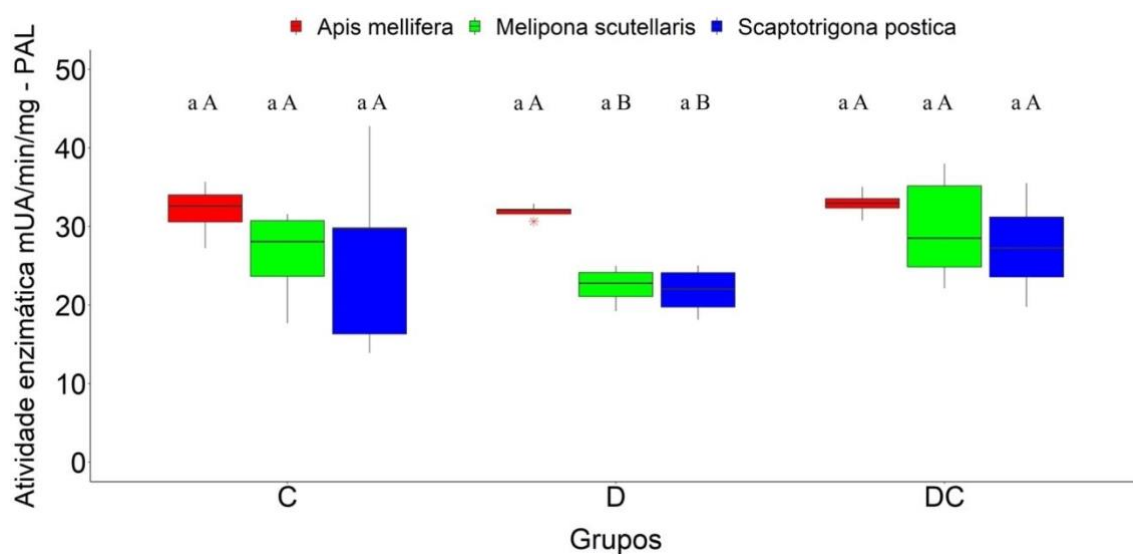
Para a enzima POX foi possível observar que não houve diferença estatística entre o controle e os grupos D e DC. Por outro lado, quando comparamos as espécies dentro de cada grupo, foi possível observar diferença estatística entre todos os grupos, ocorrendo uma expressão mais alta da enzima fenol oxidase para as espécies *M. scutellaris* e *S. postica* quando comparada a espécie *A. mellifera* (Figura 5).

Figura 5: Boxplot mostrando a atividade enzimática da fenol-oxidase (POX). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (0,77ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



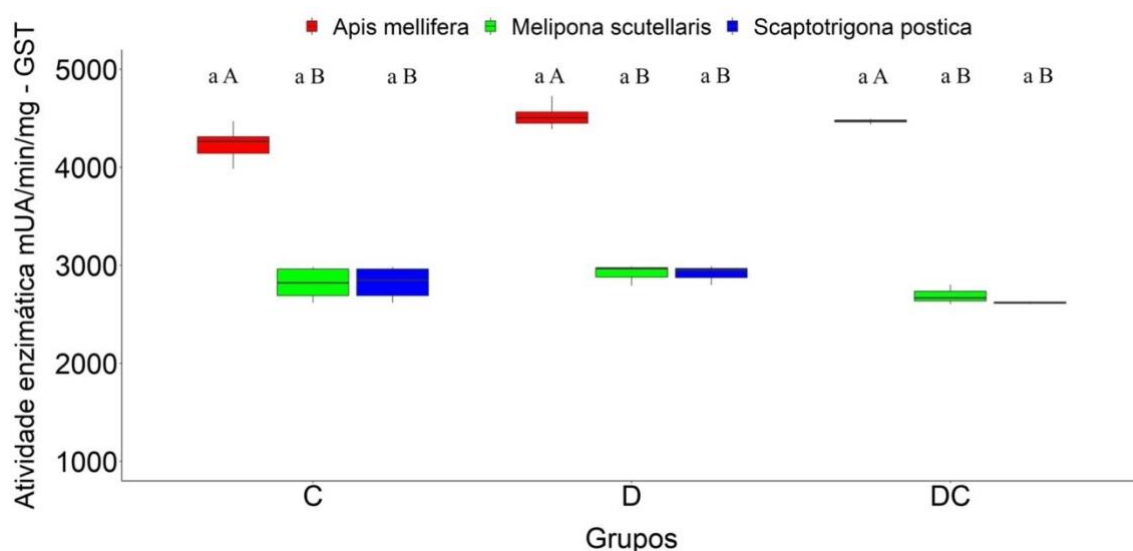
Para a enzima PAL observamos que não houve diferença estatística entre os grupos das três espécies. Porém, houve uma diferença significativa quando se comparou a atividade enzimática das espécies *M. scutellaris* e *S. postica* para o grupo D em relação a *A. mellifera*. (Figura 6).

Figura 6: Boxplot mostrando a atividade enzimática da fosfatase alcalina (PAL). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (0,77ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



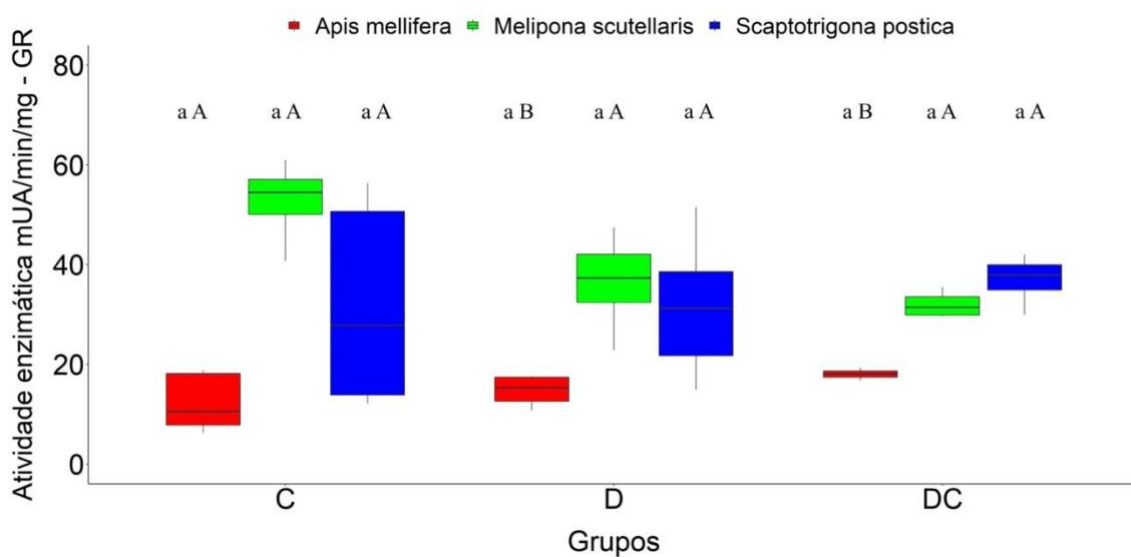
Na enzima GST foi observado que a atividade enzimática para as espécies *A. mellifera*, *S. postica* e *M. scutellaris* não apresentou diferença estatística entre o controle e os grupos D e DC. Porém houve diferença estatística dentro de todos os grupos quando se compara *A. mellifera* com as outras espécies de abelha sem ferrão, pois houve um aumento da atividade enzimática da espécie exótica (Figura 7).

Figura 7: Boxplot mostrando a atividade enzimática da glutathione-S-transferase (GST). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (0,77ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



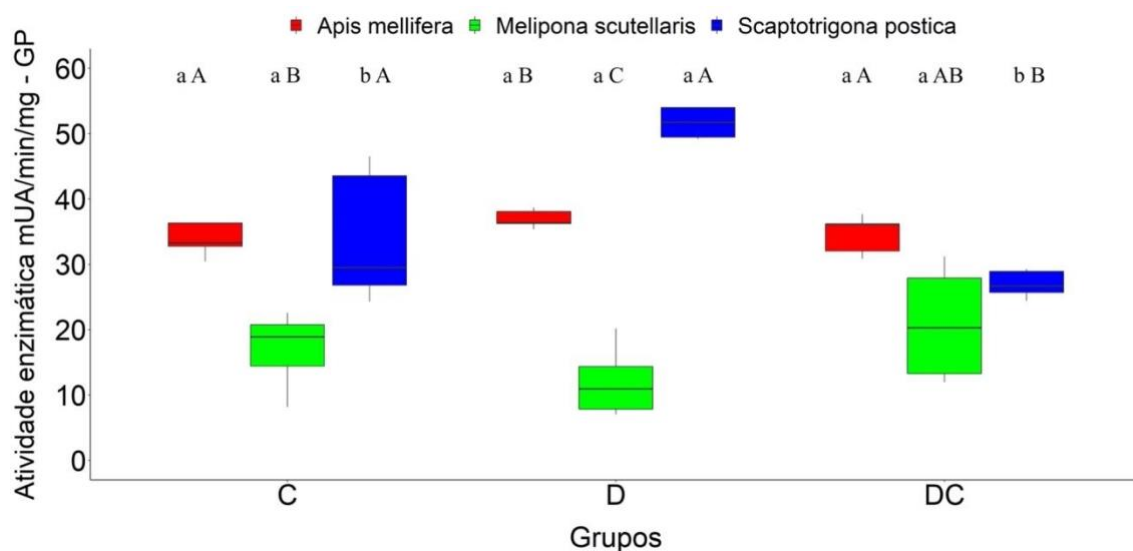
Para a enzima GR pode se observar que não houve diferença estatística entre os grupos das três espécies. Quando comparamos as espécies para cada grupo, pode se notar que há diferença estatística nos grupos D e DC quando se compara *A. mellifera* com as espécies nativas, pois as mesmas expressaram mais atividade enzimática que a espécie exótica.

Figura 8: Boxplot mostrando a atividade enzimática da glutathione redutase (GR). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (0,77ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



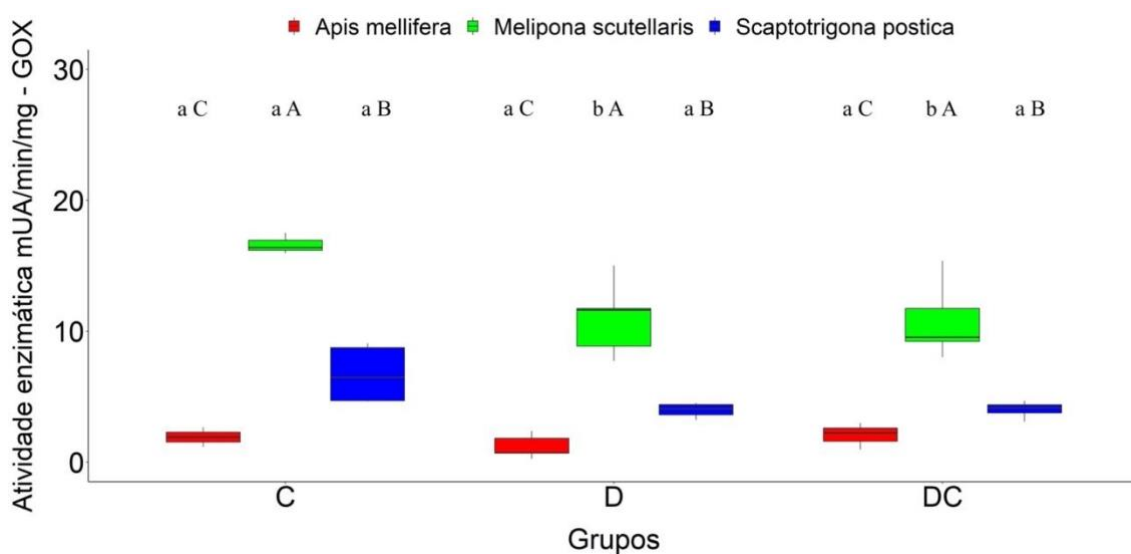
Na enzima GP houve uma diferença significativa quando comparado o grupo controle com o grupo DC para *S. postica*, havendo uma diminuição da atividade enzimática no grupo DC em relação ao controle. Quando comparadas as espécies dentro de cada grupo foi possível observar diferença estatística entre *M. scutellaris* quando comparada ao *A. mellifera* e a *S. postica* no grupo controle. Dentro do grupo D, houve diferença significativa entre todas as espécies e no grupo DC, houve diferença estatística quando comparado *A. mellifera* com *S. postica*.

Figura 9: Boxplot mostrando a atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GP). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (0,77ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



Para a enzima glicose oxidase (GOX) houve uma diferença significativa quando comparado o grupo controle com os grupos tratados para *M. scutellaris*. Quando comparadas as espécies dentro de cada grupo foi possível observar diferença estatística entre todas as espécies, ocorrendo uma expressão mais alta da enzima para as espécies de abelhas nativas.

Figura 10: Boxplot mostrando a atividade enzimática da glicose oxidase (GOX). *Apis mellifera* em vermelho e *Melipona scutellaris* em verde e *Scaptotrigona postica* em azul, expostas a doses realistas de campo do FPF (7,7 ng / μ L) dose realística de campo/10 (0,77ng / μ L). As comparações foram feitas entre os grupos para as espécies e entre as espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P= 0,05$).



4. Discussão

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que a exposição das espécies *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* e *S. postica* a doses realistas de campo do inseticida FPF causam alterações na modulação das atividades enzimáticas.

A diferença da atividade da enzima AChE entre as larvas de *A. mellifera* e *S. postica*, pode indicar uma maior sensibilidade da abelha nativa quando comparada a abelha exótica, pois houve um aumento da expressão da enzima na espécie *S. postica*. Essa maior sensibilidade foi identificada através da exposição oral de larvas ao ingrediente ativo Dimetoato: *M. scutellaris* e *S. postica* foram 320 e 51 vezes mais sensíveis que *A. mellifera*, respectivamente (Dorigo et al., 2019; Rosa-Fontana et al., 2021). As abelhas passam por metamorfose completa e as larvas sofrem grandes mudanças durante essa fase, e os resultados aqui encontrados indicam que o FPF pode causar algum dano no período de desenvolvimento.

É sabido do importante papel da AChE no sistema nervoso central, porém existem a AChE não neuronais em insetos e elas são cruciais durante todos os estágios de desenvolvimento (Grunewald e Siefert, 2019; Wessler et al., 2016). No mesmo estudo, Grunewald e Siefert (2019) revisaram detalhadamente a função da AChE no desenvolvimento de abelhas e assumiram que os neonicotinoides causam deformações em abelhas, pois o alimento para crias produzidos nas glândulas hipofaríngeas de abelhas nutrizas contém concentrações milimolares de AChE, que é necessária para o desenvolvimento larval adequado. Os neonicotinoides reduzem o conteúdo de AChE secretado no alimento das crias, reduzindo o tamanho da glândula hipofaríngea e levando a deficiências de desenvolvimento dentro da colônia. Vale ressaltar que os inseticidas neonicotinoides têm o mesmo mecanismo de ação dos butenolídeos.

As carboxilesterases são enzimas de fase I e, por meio de hidrólise, reagem com compostos não polares aumentando a solubilidade deles em água e facilitando sua eliminação (Sogorb e Vilanova, 2002). As CaEs parecem muito sensíveis à exposição a agrotóxicos e podem ser facilmente moduladas por agrotóxicos sistêmicos, como mostrado para *CaEp* (Badiou-Bénéteau et al., 2012; Dussaubat et al., 2016). São enzimas que, além de estarem envolvidas na desintoxicação, também atuam na degradação do hormônio juvenil durante o desenvolvimento de abelhas. Como o hormônio juvenil está associado ao desenvolvimento, temos indícios que a quantidade de carboxilesterase nesta fase pode estar associada a desintoxicação. Conforme demonstrado em Truman e

Riddiford (1999), a CaEp na fase de pupa poderia estar relacionada com a diminuição do hormônio juvenil. Esse fato corrobora os resultados encontrados no capítulo 1 desta tese, pois houve um atraso no desenvolvimento das larvas tratadas.

A G6PDH é a principal enzima da via das pentoses fosfato que gera NADPH (Walker e Bailey, 1969) e está envolvida, entre outras coisas, na regeneração da glutatona reduzida, que contribui para o combate ao estresse oxidativo (Thomas et al., 1991). No entanto, é improvável que essa diminuição seja devido ao estresse oxidativo, pois na presença de estresse oxidativo, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD) é inibida, o que induz um desvio da glicólise para a via das pentoses fosfato e um aumento na atividade da G6PDH (Nicholls et al., 2012; Renzi et al., 2016).

As enzimas POX e GOX, além estarem relacionadas com o sistema nervoso das abelhas, estão diretamente ligadas com o sistema imune delas (White; Subers; Schepartz, 1963; Lavallo; Cox-Foster; L, 1999).

A enzima POX não apresentou diferença estatística quando se compara os grupos tratados com o controle para as três espécies, isso pode indicar que a exposição de *A. mellifera*, *M. scutellaris* e *S. postica* à concentração de campo não causaram alterações na atividade dessa enzima nessa fase do desenvolvimento. Já dentro dos grupos há diferença entre as abelhas sem ferrão com a abelha exóticas, o qual mostra que as abelhas sem ferrão possuem mais expressão dessa enzima quando comparadas a *A. mellifera*, mostrando que talvez as abelhas sem ferrão estão em um maior processo de melanização ou cicatrização, pois a avaliação da atividade dessa enzima pode ser considerada uma forma de analisar a imunocompetência através desses processos (Laughton; Boots; Siva-Jothy, 2011; González-Santoyo; Córdoba-Aguilar, 2012).

No presente trabalho foi observada uma alteração nos níveis de GOX quando se comparado os grupos entre si, mesmo não havendo uma diferença estatística significativa. A enzima Glicose oxidase (GOX) tem como principal função catalisar a produção de peróxido de hidrogênio para que os produtos da colônia (mel e própolis) possam ser esterilizados, participando assim da imunidade social (Alaux et al., 2010; Bucekova et al., 2014). A secreção de compostos antissépticos na ração e no mel constitui outro tipo de imunidade social. Curiosamente, a interação entre parasitismo e exposição à agrotóxicos induziu uma imunossupressão no nível social, causando um declínio significativo da atividade de GOX. Essa enzima é essencial na produção do antisséptico e, portanto, na esterilização do alimento larval (Sano et al., 2004) e do mel (White et al., 1963; Ohashi et al., 1999). Como resultado, se a colônia não for capaz de manter os níveis

de atividade de GOX recrutando mais operárias para esta tarefa, uma redução de antissépticos na colônia afetaria não apenas as companheiras de ninho adultas, mas também a sobrevivência da ninhada, enfraquecendo a colônia a longo prazo. Mesmo que a colônia responda com precisão à necessidade de produção de antissépticos por meio de um recrutamento maciço de trabalhadores, isso reduziria a alocação de operárias em outras tarefas (como coleta de alimentos) e, portanto, induziria também um custo para a colônia.

A PAL é uma enzima que participa principalmente dos processos digestivos, incluindo o transporte de metabólitos e antioxidantes e também está envolvida na manutenção da imunidade intestinal local (Chen et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Tadei et al. 2019). No presente trabalho foi observada uma diferença estatística dentro do grupo D, quando se compara *A. mellifera* com as abelhas nativas, isso pode estar ligado a diferenças na biologia do indivíduo, já que a metamorfose das abelhas nativas demora mais tempo para acontecer do que em abelhas *Apis* (Dorigo et al., 2019; Rosa-Fontana et al., 2020).

Os mecanismos fisiológicos das abelhas contam com diversas enzimas dentre elas GP e GR que atuam na proteção contra o estresse oxidativo. A GP catalisa a formação de glutathione oxidase (GSSG), que é posteriormente convertida em GSH pela enzima glutathione reductase (GR).

Baliera et al. (2020) investigaram os efeitos do imidacloprido no sistema antioxidante celular de abelhas *A. mellifera* e descobriram que o neonicotinóide aumenta a atividade das enzimas antioxidantes GP no tórax de abelhas como um indicador de indução de estresse oxidativo. Com esses dados, podemos inferir que o controle do estresse oxidativo será impactado pelo uso de agrotóxicos, pois podem causar um desequilíbrio fisiológico. Tal desequilíbrio afetaria principalmente as abelhas sem ferrão, pois o estudo mostra que há uma maior atividade enzimática nas espécies *M. scutellaris* e *S. postica*.

A GST é uma enzima envolvida na desintoxicação de xenobióticos e atua na fase II. A GST é a principal enzima contra o estresse oxidativo e é apontada como responsável pela resistência dos agrotóxicos (Berenbaum et al., 2015). Neste trabalho, a diferença estatística na expressão de GST nos leva a supor que os processos nos quais a GST está ligada estão sendo mais efetivos que nas espécies nativas. O aumento da atividade dessa enzima, como relatado nesse estudo, pressupõe que esteja ocorrendo algum processo de metabolização do agrotóxico.

Este é o primeiro estudo a avaliar o FPF em estágios larvais de *A. mellifera*, *M. scutellaris* e *S. postica* no Brasil. Por meio de uma abordagem comparativa utilizando biomarcadores, foi demonstrado que as três espécies possuem respostas distintas ao ingrediente ativo enfatizando suas particularidades em uma futura avaliação de risco. Essas particularidades mostram que as espécies sem ferrão não possuem o mesmo padrão de resposta que as abelhas *Apis* e, portanto, devem entrar como possíveis espécies em AR para regulamentação dos agrotóxicos. O uso de biomarcadores são aplicáveis a esse tipo de estudo, pois indicam os efeitos subletais que venham a ocorrer.

5. Conclusão

Este é o primeiro estudo a relatar os efeitos de FPF em duas espécies de abelhas sem ferrão com abordagem comparativa a abelhas africanizadas, durante a fase de desenvolvimento. Os biomarcadores enzimáticos de enzimas metabólicas, antioxidantes e de desintoxicação aqui utilizados, claramente demonstraram sua eficácia na identificação de efeitos subletais, apontando diferentes respostas da exposição para as espécies de abelhas analisadas. Dessa forma, o uso dessas ferramentas moleculares demonstra grande potencial para contribuir em futuras decisões de órgãos regulatórios para análise de risco. Além disso, os resultados aqui apresentados encorajam o desenvolvimento de novos estudos com foco em abelhas sem ferrão, pois os dados obtidos para *A. mellifera* não podem ser extrapolados para outras espécies de abelhas, incluindo *M. scutellaris* e *S. postica*.

6. Referências

- ALAUX, Cédric et al. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 774–782, 2010. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02123. x.
- AUPINEL, Pierrick et al. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology*, v. 58, n. 2, p. 107, 2005.
- AUPINEL, Pierrick et al. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, v. 63, n. 11, p. 1090-1094, 2007.

BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L.P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase – A biomarker to detect deltamethrin exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, p. 246-253, 2008.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A.; CARVALHO, S. M.; BRUNET, J. L.; CARVALHO, G. A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L.P. 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.

BALIEIRA, Kamila Vilas Boas et al. Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie*, v. 49, n. 5, p. 562-572, 2018.

BARBOSA, R. A. Avaliação dos efeitos de concentrações subletais de dimetoato no cérebro e ventrículo de *Apis mellifera* africanizada. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. Rio Claro, São Paulo, 94 f. 2015.

Bayer CropScience. New Insecticide Sivanto™ Registered in the USA (2015). Available at: <http://media.bayer.com/baynews/baynews.nsf/id/Newinsecticide-Sivanto-registered-in-the-USA> (Accessed March 15, 2022).

BERENBAUM, May R.; JOHNSON, Reed M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current opinion in insect science*, v. 10, p. 51-58, 2015.

BERNARDES, Rodrigo Cupertino et al. The reduced-risk insecticide azadirachtin poses a toxicological hazard to stingless bee *Partamona helleri* (Friese, 1900) queens. *Chemosphere*, v. 201, p. 550-556, 2018.

BOFF, Samuel et al. Changes in social behavior are induced by pesticide ingestion in a Neotropical stingless bee. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 164, p. 548-553, 2018.

BOYLE, Natalie K. et al. Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. *Environmental entomology*, v. 48, n. 1, p. 4-11, 2019.

BPBES. Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. [s.l: s.n.].

BROECKX, Bart JG et al. Honey bee predisposition of resistance to ubiquitous mite infestations. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

BUCEKOVA, M.; VALACHOVA, I.; KOHUTOVA, L.; PROCHAZKA, E.; KLAUDINY, J., &. MAJTAN, J. Honeybee glucose oxidase—its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H₂O₂-mediated

antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften*, [S. l.], v. 101, n. 8, p. 661–670, 2014.

CARVALHO, Stephan M. et al. 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, n. 9, p. 2117-2124, 2013.

CHAM, K. O. et al. Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. in *Environmental Entomology* 48, (2019).

CHEN, Kathryn T. et al. A role for intestinal alkaline phosphatase in the maintenance of local gut immunity. *Digestive diseases and sciences*, v. 56, n. 4, p. 1020-1027, 2011.

CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R. M.; BISWAS, S.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J. G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Molecular Biology*, USA, v. 5, n. 15, p.615-636, 2006

CULLEN, Merissa G. et al. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. *PLoS One*, v. 14, n. 12, p. e0225743, 2019.

DA COSTA, Leticia Mariano et al. Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, v. 62, n. 4, p. 578-582, 2015.

DA SILVA PINTO, Thandy Junio et al. Functional responses of *Hyalella meinerti* after exposure to environmentally realistic concentrations of 2, 4-D, fipronil, and vinasse (individually and in mixture). *Aquatic Toxicology*, v. 231, p. 105712, 2021.

DE MORAIS, Cássio Resende et al. Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). *Chemosphere*, v. 206, p. 632-642, 2018.

DE OLIVEIRA JACOB, Cynthia Renata et al. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille)(Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, v. 224, p. 65-70, 2019.

DE OLIVEIRA, José Silonardo Pereira et al. Mutagenic, genotoxic and morphotoxic potential of different pesticides in the erythrocytes of *Podocnemis expansa* neonates. *Science of the Total Environment*, v. 737, p. 140304, 2020.

DECIO, P.; USTAOGLU, P.; ROAT, T. C.; MALASPINA, O.; DEVAUD, J-M.; STÖGER, R.; SOLLER, M. Acute thiamethoxam toxicity in honeybees is not enhanced by common fungicide and herbicide and lacks stress-induced changes in mRNA splicing. *Scientific Reports*. v. 9, p. 1-10, 2019.

DESNEUX, Nicolas; DECOURTYE, Axel; DELPUECH, Jean-Marie. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annu. Rev. Entomol., [S. l.]*, v. 52, p. 81–106, 2007.

DORIGO, Adna et al. Biological data of stingless bees with potential application in pesticide risk assessments. *Sociobiology*, v. 65, n. 4, p. 777-779, 2018.

DORIGO, Adna Suelen et al. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PLoS One*, v. 14, n. 3, p. e0213109, 2019.

DUPRAZ-DOBIAS, Paula. France bans all uses of neonicotinoid pesticides. *Chemical & Engineering News*, v. 96, n. 36, p. 15-15, 2018.

DUSSAUBAT, C.; MAISONNASSE, A.; CRAUSER, D.; TCHAMITCHIAN, S.; BONNET, M.; COUSIN, M.; KRETZSCHMAR, A.; BRUNET, J. L.; LE CONTE, Y. Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. *Scientific reports*, v. 6, p. 1-7, 2016

GILBERT, M. D.; WILKINSON, C. F. An inhibitor of microsomal oxidation from gut tissues of the honey bee (*Apis mellifera*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 50, n. 4, p. 613-619, 1975.

GONG, Youhui; DIAO, Qingyun. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology*, v. 26, n. 1, p. 1-12, 2017.

GONZÁLEZ-SANTOYO, Isaac; CÓRDOBA-AGUILAR, Alex. Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata, [S. l.]*, v. 142, n. 1, p. 1–16, 2012. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x.

GRÜNEWALD, Bernd; SIEFERT, Paul. Acetylcholine and its receptors in honeybees: involvement in development and impairments by neonicotinoids. *Insects*, v. 10, n. 12, p. 420, 2019.

HYNE, Ross V.; MAHER, William A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 54, n. 3, p. 366-374, 2003.

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/not_tecnica_avaliacao_de_risco_de_agrotoxicos.pdf> Acessado em 30 Junho 2022

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização. 2004

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; NUNES-SILVA, Patrícia. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 59-62, 2010.

JACOB, Cynthia RO et al. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*, v. 28, n. 7, p. 744-753, 2019.

JOHNSON, Reed M. et al. Honey bee toxicology. *Annu. Rev. Entomol.*, v. 60, n. 1, p. 415-434, 2015.

JOKANOVIĆ, Milan. Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, v. 166, n. 3, p. 139-160, 2001.

KERR, Jeremy T. et al. Climate change impacts on bumblebees converge across continents. *Science*, v. 349, n. 6244, p. 177-180, 2015.

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.

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.

LAUGHTON, Alice M.; BOOTS, Michael; SIVA-JOTHY, Michael T. The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, [S. l.], v. 57, n. 7, p. 1023–1032, 2011. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.04.020.

LOVALLO, Naomi; COX-FOSTER;; L, Diana. Alteration in FAD–glucose dehydrogenase activity and hemocyte behavior contribute to initial disruption of *Manduca sexta* immune response to *Cotesia congregata* parasitoids. *Journal of Insect Physiology*, [S. l.], v. 45, n. 12, p. 1037–1048, 1999.

MASOOD, Muhammad Irfan et al. Environment permissible concentrations of glyphosate in drinking water can influence the fate of neural stem cells from the subventricular zone of the postnatal mouse. *Environmental Pollution*, v. 270, p. 116179, 2021.

MENEZES, C; VOLLET-NETO, A; IMPERATRIZ - FONSECA, V. L. An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. *Apidologie*, 44.5: 491-500, 2013

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

MENEZES, Cristiano, et al. A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology*, v.25, n..21, p. 2851-2855, 2015.

MESNAGE, Robin et al. Use of shotgun metagenomics and metabolomics to evaluate the impact of glyphosate or Roundup MON 52276 on the gut microbiota and serum metabolome of Sprague-Dawley rats. *Environmental health perspectives*, v. 129, n. 1, p. 017005, 2021.

MICHENER, C.D. Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees, 2013.

MOGREN, Christina L.; LUNDGREN, Jonathan G. Neonicotinoid-contaminated pollinator strips adjacent to cropland reduce honey bee nutritional status. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.

Moreira, D. R., Sinópolis, A. A. G., Falco, J. R. P., Julio, A. H. F., Volnistem, E. A., Chagas, F. D., ... Ruvoilo-Takasusuki, M. C. C. (2018). Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Toxicology*, 33(4), 463-475. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.22533>

NAUEN, Ralf et al. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest management science*, v. 71, n. 6, p. 850-862, 2015.

NICHOLLS, Elizabeth. The role of pollen as a reward for learning in bees. 2012.

NOCELLI, R. C. et al. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. *Semana dos Polinizadores*, v. 3, p. 196-212, 2012.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. 1997.

OECD (2013), Test No. 237: Honey Bee (*Apis Mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203723-en>.

OHASHI, Kazuaki; NATORI, Shunji; KUBO, Takeo. Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry*, v. 265, n. 1, p. 127-133, 1999.

OTESBELGUE, Alex; DOS SANTOS, Charles Fernando; BLOCHTEIN, Betina. Queen bee acceptance under threat: Neurotoxic insecticides provoke deep damage in queen-worker relationships. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 166, p. 42-47, 2018.

PALUDO, Camila R. et al. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

PEDRO, Silvia RM. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PETTIS, Jeffery S. et al. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PloS one*, v. 8, n. 7, p. e70182, 2013.

PIRES, Carmen Silvia et al. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: are there cases of CCD?. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, p. 422-442, 2016.

POTTS, Simon G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature Publishing Group, [S. l.]*, v. 540, n. 7632, p. 220–229, 2016. DOI: 10.1038/nature20588.

RAVAIANO, Samira Veiga et al. Acute and oral exposure to imidacloprid does not affect the number of circulating hemocytes in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* post immune challenge. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 152, p. 24-28, 2018.

RENZI, Maria Teresa et al. Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 127, p. 205-213, 2016.

ROSA, Annelise de Souza et al. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. *Apidologie*, v. 47, n. 6, p. 729-738, 2016.

ROSA, Jaqueline Figuerêdo et al. Permeability of matrices of agricultural crops to *Euglossina* bees (Hymenoptera, Apidae) in the Atlantic Rain Forest. *Apidologie*, v. 46, n. 6, p. 691-702, 2015.

ROSA-FONTANA, Annelise et al. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. *Environmental Pollution*, v. 265, p. 114849, 2020.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, v. 37, p. 124–143, 2006.

SÁNCHEZ-BAYO, Francisco. The trouble with neonicotinoids. *Science*, v. 346, n. 6211, p. 806-807, 2014..

SANO, Osamu et al. Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 1, p. 15-20, 2004.

SEIDE, Vanessa Eler et al. Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. *Environmental Pollution*, v. 243, p. 1854-1860, 2018.

SILVA, A. C. A. Biomarcadores de Contaminação Ambiental. Projeto de Pós-Graduação, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 57 f., 2016.

SILVA, A. C. Implicações na implantação da meliponicultura e etnobiologia de abelhas sem ferrão em três comunidades indígenas no estado do Amazonas. 2006.

SILVA, Carina Aparecida de Souza. Análise dos efeitos do fipronil e dimetoato em larvas e pupas de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) africanizada criadas em condições laboratoriais. 2014.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A R.; ALMEIDA, E. A B. ABELHAS BRASILEIRAS: Sistemática e Identificação. 1a edição ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: Fundação Araucária, 2002

SOARES-LIMA, H. M. Efeitos combinados de *Nosema ceranae* e do inseticida imidacloprido sobre abelhas *Apis mellifera* africanizada. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro. Rio Claro, São Paulo, 140 f. 2017.

SOGORB, Miguel A.; VILANOVA, Eugenio. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicology letters*, v. 128, n. 1-3, p. 215-228, 2002.

STOKSTAD, Erik. European Union expands ban of three neonicotinoid pesticides. *Science*, v. 10, 2018.

SUPPA, Antonio et al. Roundup causes embryonic development failure and alters metabolic pathways and gut microbiota functionality in non-target species. *Microbiome*, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2020.

SURYANARAYANAN, Sainath; KLEINMAN, Daniel Lee. Be (e) coming experts: The controversy over insecticides in the honey bee colony collapse disorder. *Social Studies of Science*, v. 43, n. 2, p. 215-240, 2013.

Tadei, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. *Sci. Rep.* 9, 1–11 (2019).

TAVARES, D. A.; DUSSAUBAT, C.; KRETZSCHMAR, A.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O.; BÉRAIL, G.; BRUNET, J. L.; BELZUNCES, L. P. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and

physiology of the honey bee at post-embryonic stages. *Environmental Pollution*, v. 229, p. 386-393, 2017.

TOSI, Simone et al. Long-term field-realistic exposure to a next-generation pesticide, flupyradifurone, impairs honey bee behaviour and survival. *Communications biology*, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2021.

TOSI, Simone; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 286, n. 1900, p. 20190433, 2019.

TRUMAN, James W.; RIDDIFORD, Lynn M. The origins of insect metamorphosis. *Nature*, v. 401, n. 6752, p. 447-452, 1999.

WALKER, P. R.; BAILEY, E. A comparison of the properties of the phosphofructokinases of the fat body and flight muscle of the adult male desert locust. *Biochemical Journal*, v. 111, n. 3, p. 365-369, 1969.

WESSLER, Hartmut et al. Global multimodal news frames on climate change: A comparison of five democracies around the world. *The International Journal of Press/Politics*, v. 21, n. 4, p. 423-445, 2016.

WHITE, Jonathan W.; SUBERS, Mary H.; SCHEPARTZ, Abner I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 57–70, 1963. DOI: 10.1016/0006-3002(63)90359-7.

YU, S. J.; ROBINSON, F. A.; NATION, J. L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 22, n. 3, p. 360-368, 1984.

Capítulo 3

O artigo referente a este capítulo será submetido para publicação na Apidologie.

Impacto do inseticida flupiradifurona no sistema imunológico de *Apis mellifera*, *Scaptotrigona postica* e *Melipona scutellaris* em diferentes fases de desenvolvimento

DORIGO, A.S.¹, ROSA-FONTANA A.S.¹, GRELLA, T.C¹ NOCELLI, R.C.F.², MALASPINA, O.¹

¹ Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-SP), Rio Claro, SP, Brasil.

² Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-SP), Araras, SP, Brasil.

1. Introdução:

A redução do número de espécies e populações em polinizadores manejados e silvestres vem chamando atenção contínua em todo o mundo. No entanto, as causas de tais declínios permanecem controversas (Goulson et al., 2015). O consenso geral aponta para um complexo de interações, entre as quais, acredita-se que o uso de agrotóxicos, a ocorrência de parasitas e perda de habitat sejam os principais fatores associados (Vanbergen et al., 2013; Goulson et al., 2015)

O uso de inseticidas sistêmicos em cultivos agrícolas pode contaminar os recursos coletados pelas abelhas, podendo levar à mortandade devido a sua toxicidade. Esses recursos, explorados por abelhas camperias, são contaminados por doses subletais de inseticidas, as quais não ocasionam mortalidade imediata das abelhas, possibilitando sua coleta e posterior estocagem nas colônias. No inverno, quando as abelhas tem menor disponibilidade de fontes de alimento e se tornam mais dependentes do alimento estocado nas colônias pode ocorrer maior perda de enxames devido ao consumo de alimento contaminado com doses subletais de inseticidas (Page e Peng 2001; Oldroyd 2007; Williams et al. 2010; Kaplan 2014; Tosi et al., 2019). Além da morte das abelhas, a exposição a doses subletais de inseticidas pode comprometer o desenvolvimento

embrionário e larval, da diferenciação celular, da visão, da reprodução e da capacidade de resposta do sistema imunológico (Helmer et al., 2014).

O sistema imunológico das abelhas é altamente sensível quando comparado ao de outros insetos, possuindo apenas 2/3 dos genes de imunidade (Chan et al., 2009). As abelhas não possuem memória imunológica, não sendo capazes de adquirir um sistema imune, apresentando assim um sistema dividido em Sistema Imune Social e Sistema Imune Inato (Lavine & Strand, 2002). Segundo Meunier et al. (2015), o sistema imune social consiste nas ações coletivas que visam evitar a infecção dos membros de um grupo de insetos, sendo elas: proteger o ninho de insetos contaminados, evitar locais com fungos ou outros contaminantes, incorporar substâncias químicas anticontaminantes ao ninho, saneamento (limpeza do ninho), aplicação de substâncias antimicrobianas na ninhada, transferência de componentes imunes para os ovos, etc. O sistema imune inato é um mecanismo de defesa fundamental contra parasitas e está envolvido em processos fisiológicos relacionados a atividades como cicatrização de feridas (Schmid-Hempel et al., 2011; Krautz et al., 2014). Ele é responsável principalmente pelas barreiras físicas e celulares, sendo que essa última se utiliza de dois tipos de reações, a reação humoral e a reação celular (Armstrong et al., 1996; Kavanagh & Reeves, 2004).

Os mecanismos de imunidade celular em abelhas ainda não são completamente compreendidos, principalmente devido a informações limitadas sobre os subtipos celulares, suas funções e abundâncias (Graaf et al., 2002; Negri et al., 2014; Marringa et al., 2014). A reação humoral consiste na coagulação da hemolinfa, melanização e ação de proteínas, enquanto a reação celular está relacionada à atividade dos hemócitos, que são células de defesa presentes na hemolinfa (Armstrong et al., 1996; Cruz-Landim, 2009). Os hemócitos desempenham diversas funções, como a fagocitose, nodulação, encapsulação, citotoxicidade por meio da produção de reativos intermediários de oxigênio, secreção de enzimas e coagulação da hemolinfa após a ruptura da cutícula e epiderme (Gillespie et al., 1997; Lavine; Strand, 2002; Kavanagh & Reeves, 2004; Cruz-Landim, 2009). Os hemócitos são células facilmente acessíveis e contáveis, possibilitando assim avaliar a influência de diferentes fatores externos no funcionamento do sistema imunológico (Gupta et al., 1985). Para determinar essas alterações, utiliza-se a técnica de contagem de hemócitos totais, a qual representa o número total de hemócitos por mm³ de hemolinfa, (Cruz-Landim, 2009).

O número de hemócitos presentes na hemolinfa é de extrema importância para que o organismo possa se defender de modo eficiente contra agrotóxicos, por meio da

melanização (Cruz-Landim, 2009). É sabido que a exposição das abelhas a agrotóxicos pode causar alterações no sistema imune inato, alterando sua capacidade de defesa, como respostas antivirais e superexpressão das enzimas de desintoxicação produzidas no corpo gorduroso e intestino médio (Alaux et al., 2010; Garrido et al., 2013; Mason, 2013). Diversos trabalhos mostram que alterações no sistema imune, uma vez que os agrotóxicos alteram a quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa e a morfologia das células do corpo gorduroso, afetando seu desempenho (Brandt et al., 2016; Domingues et al., 2017; Tavares et al., 2017). Além do efeito dos agrotóxicos, o estágio de vida das abelhas também influencia na quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa, sendo que alguns trabalhos relacionados à contagem de hemócitos demonstram que a quantidade dessas células reduz com o aumento da idade e casta (Snodgrass, 1956; Gilliam, & Shimanuki, 1966; Cruz-Landim, 2009).

Além disso, o estágio de vida das abelhas também influencia na quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa, sendo que alguns trabalhos relacionados à contagem de hemócitos demonstram que a quantidade dessas células reduz com o aumento da idade e casta (Snodgrass, 1956; Gilliam, & Shimanuki, 1966; Cruz-Landim, 2009).

Os inseticidas butenolídeos compartilham seu modo de ação com os neonicotinoides, sendo agonistas seletivos dos receptores nicotínicos de acetilcolina (NACHRs) (Zhu et al., 2011; Sparks et al., 2013), e configuram uma das entradas mais recente no mercado de inseticidas. Atualmente, a Flupiradifurona - FPF ($C_{12}H_{11}ClF_2N_2O_2$) está aprovada para uso em mais de 80 países em todo o mundo, com efeitos sobre insetos polinizadores potencialmente comparáveis aos dos inseticidas neonicotinoides (Siviter et al., 2018a, 2020b). A exposição a dosagens altas e não realistas de FPF em campo demonstrou afetar as habilidades sensoriais (sabor), cognitivas e motoras das abelhas (Hesselbach e Scheiner, 2018, 2019). Em doses realistas de FPF em campo, no pior cenário, houve uma redução significativa no desempenho de aprendizagem associativa olfativa observada nas espécies de abelhas *Apis cerana* (Tan et al., 2017). Efeitos mais sutis de FPF em *A. mellifera* ocorrem em sinergia com outros fatores, como idade da abelha, sazonalidade, estresse nutricional e exposição a outros produtos químicos (Tong et al., 2019; Tosi e Nieh, 2019). Hesselbach et al. (2020) mostraram que a exposição crônica ao FPF pode levar ao início prematuro do forrageamento em *A. mellifera*. Além disso, a exposição a taxas de campo de FPF também demonstrou aumentar o estresse oxidativo e induzir apoptose em *A. mellifera* (Chakrabarti et al., 2020). Recentemente, foi demonstrado que a exposição crônica ao

FPF afeta as abelhas muito além da exposição imediata, e está associada a um aumento da intensidade da infecção por *Nosema ceranae* (Al Naggar e Baer, 2019).

As abelhas sem ferrão utilizadas nesse estudo foram escolhidas com base na lista de espécies prioritárias para avaliação de risco de agrotóxicos, publicada pelo IBAMA. As espécies *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) e *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) constam na referida lista entre as cinco principais. Entretanto, os indivíduos de *T. spinipes* têm comportamento agressivo e não existe método de criação em caixas de madeira (criação racional). Assim, *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) foi selecionada, uma vez que apresenta similaridades morfológicas e biológicas com *T. spinipes*. *Apis mellifera* é o organismo modelo para testes de avaliação de risco no Brasil e também um importante polinizador da agricultura do país.

O uso de agrotóxicos pode afetar o sistema imune das abelhas podendo levar o indivíduo a morte (Božena; Jędruszk, 2003). Dessa forma, a análise da quantidade de hemócitos é uma ferramenta essencial para avaliar as respostas celulares de abelhas expostas a agrotóxicos (Malaspina; Silva-Zacarin, 2006). Assim sendo, presente trabalho teve como finalidade avaliar os efeitos sobre o sistema imune, do inseticida FPF em larvas e abelhas recém-emergidas de *A. mellifera*, *M. scutellaris* e *S. postica* através das técnicas de contagem de hemócitos.

2. Materiais e Métodos:

Coleta do material biológico para bioensaios in vitro

Favos com larvas das espécies *A. mellifera*, *M. scutellaris* e *S. postica* foram coletados de colônias não parentais do apiário e meliponário do Departamento de Biologia Geral e Aplicada da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro. Para as coletas foram selecionadas três colônias fortes, estabelecidas com base no número de indivíduos e rainha jovem. A coleta foi realizada respeitando intervalos de 40 dias para a recuperação e desenvolvimento de novas operárias, de modo que não prejudicasse sanidade das colônias. Dessa forma, foram coletados favos contendo ovos para a retirada do alimento larval e favos contendo larvas de primeiro instar (recém-eclodidas) para os bioensaios de criação in vitro.

Obtenção das concentrações/doses realistas de campo para a Flupiradifurona

O ingrediente ativo utilizado nos bioensaios foi a Flupiradifurona PESTANAL® ($C_{12}H_{11}Cl F_2N_2O_2$), padrão analítico Sigma-Aldrich, pureza $\geq 98,0\%$, lote: BCCB1463. Para os bioensaios foram utilizadas concentrações realistas de campo, considerando o pior cenário de aplicação. Para os cálculos foram utilizadas como base as culturas de café, tomate e citros.

Para obter essa concentração realística de campo, foi utilizado o perfil ambiental do ingrediente ativo Flupiradifurona, publicado pelo IBAMA em 2019, que tem como base a bula do produto formulado disponível no mercado. Outra ferramenta também utilizada foi o BeeRex, desenvolvido pela US-EPA (United States Environmental Protection Agency), o qual foi incorporado para uso nas avaliações de risco pelo IBAMA.

Com base nos cálculos para obtenção da dose realística de campo, foi encontrada a concentração/dose de 7,7 ng/ μ L (DC) de alimento larval. Foi utilizado nos bioensaios também a concentração/dose de 0,77 ng/ μ L (D), que corresponde a concentração realística de campo dividida 10 vezes. É importante salientar que tal ingrediente ativo é considerado como risco ambiental: III - Produto perigoso, conforme informações do perfil ambiental do produto (IBAMA, 2019).

Bioensaios in vitro com *Apis mellifera*

Para os bioensaios foram utilizados os protocolos para desenvolvimento larval descritos em Aupinel et al., 2003 e Aupinel et al., 2005, que são a base para a normativa OECD 237, com adaptações feitas por Dorigo et al., 2015. Todo o procedimento está descrito no capítulo 1.

Bioensaios in vitro com espécies sem ferrão: *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica*

Para os bioensaios foram utilizados os protocolos para desenvolvimento larval descritos em Dorigo et al., 2019 e Rosa-Fontana et al., 2020. Todo o procedimento está descrito no capítulo 1.

Coleta de hemolinfa

Para a coleta da hemolinfa foram utilizadas 15 larvas de cada grupo experimental, sendo 5 de cada colônia. A hemolinfa foi extraída seguindo o método descrito por Butolo

e colaboradores (2021). A larva foi mantida imóvel e a região da cabeça foi totalmente exposta. Posteriormente, uma pequena incisão foi realizada na cutícula correspondente à região da cabeça da larva e procedeu-se com a aplicação de uma leve pressão sobre o corpo até o extravasamento da hemolinfa. O líquido foi coletado (5uL) com o auxílio de uma micropipeta automática e, posteriormente, a hemolinfa foi acondicionada em microtubos de polipropileno de 0,5mL (uma larva por microtubo).

Contagem total de hemócitos

Após a extração de 5uL de hemolinfa de cada indivíduo, a mesma foi misturada com 5uL do corante azul de metileno 2% (v/v). Em seguida, foi colocado 5uL da solução em cada lado da câmara de Neubauer e, com auxílio do microscópio de luz de campo claro (OLYMPUS, modelo BX51) e objetiva de 40X (aumento final de 400X), procedeu-se a contagem em 5 quadrantes da câmara.

Após a contagem do número de hemócitos, foi utilizada a fórmula adaptada por Domingues e colaboradores (2017) para obter o valor de hemócitos/mL de hemolinfa. Sendo o fator de diluição (FD) utilizado para todas as amostras é 2 e o fator de correção (FC) é 10^4 , número este pré-estabelecido para câmara de Neubauer.

$$\text{Hemócitos/mL} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de hemócitos contados}}{\text{n}^\circ \text{ de quadrantes contados}} \times FD \times FC$$

Análises estatísticas

Os dados originais ou transformados pelo método de Box-Cox (1964) não atenderam as pressuposições do modelo da análise de variância (normalidade e homogeneidade). Dessa forma, fez-se uso do teste de comparação das medianas. O procedimento utilizado consiste em um teste não paramétrico para múltiplas amostras independentes. Em resumo, o teste da mediana, que é disponibilizado pela função `median.test` do pacote “*agricolae*” (Mendiburu et al., 2019) do programa R (R Core Team, 2021) foi projetado para examinar se várias amostras vieram de populações com a mesma mediana.

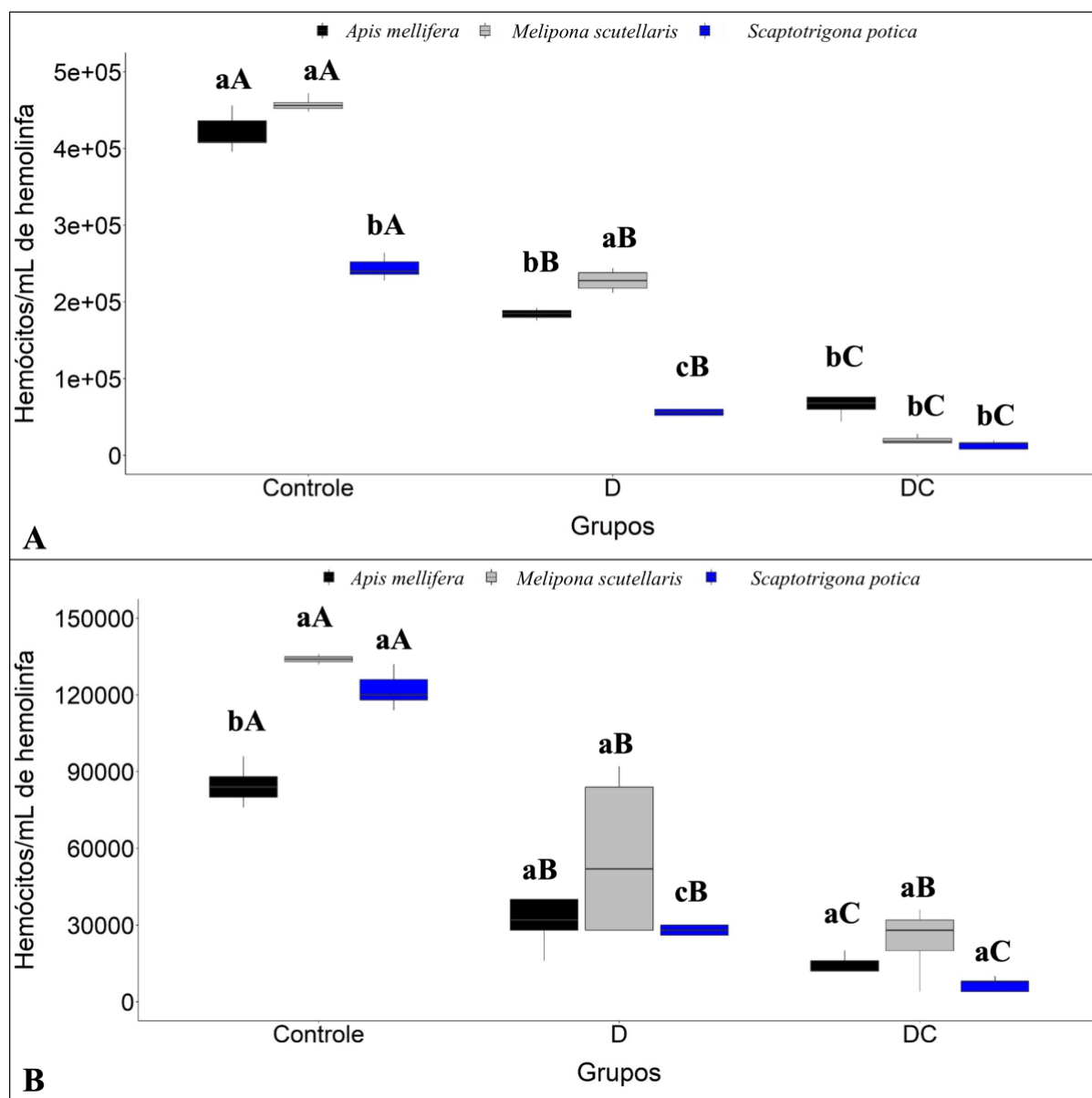
3. Resultados e discussão

A partir da análise dos dados coletados com a contagem de hemócitos na fase larval, analisamos que houve diferença significativa entre os grupos expostos D e DC com o controle para a espécie *A. mellifera*. Para a espécie *M. scutellaris* houve diferença significativa quando se comparado o grupo exposto DC com o controle, já para o grupo exposto D não foram observadas diferenças estatísticas. Na espécie *S. postica* foi analisada uma diferença estatística no grupo exposto D quando comparado ao controle. Quando comparamos as espécies dentro de cada grupo, não pudemos observar diferenças estatísticas (Figura 1 A).

Analisando os dados coletados com a contagem de hemócitos em recém-emergidas observamos que para a espécie *A. mellifera* foi observada diferença estatística quando comparado o grupo exposto DC com o controle. Para a espécie *M. scutellaris* não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos exposto e controle. Já para *S. postica* obtivemos uma diferença estatística no grupo exposto D quando comparado ao controle. Quando observamos as espécies dentro de cada grupo, houve diferença estatística quando comparamos a espécie *A. mellifera* e *S. postica* com a espécie *M. scutellaris* no grupo exposto DC; não foram observadas diferenças estatísticas para os demais grupos experimentais (Figura 1 B).

Em ambas as fases de estudo (larvas e recém-emergida), por meio da contagem dos hemócitos, foi possível constatar que os hemócitos diminuíram de acordo com a dosagem do grupo exposto, sendo $DC < D < C$. Com isso, houve uma diminuição de aproximadamente 5x no número de hemócitos no grupo DC em comparação com o controle, mostrando que o sistema imune foi afetado.

Figura 1: Boxplot ostrando os hemócitos/mL de hemolinfa em larvas (A), em recém-emergida (B). *Apis mellifera* em preto e *Melipona scutellaris* em cinza e *Scaptotrigona postica* em azul. As comparações foram feitas entre os grupos para ambas as espécies e entre as duas espécies. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas (comparações entre os grupos para a mesma espécie) e maiúsculas (comparações entre as espécies para cada grupo) diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P=0,05$).



Podemos observar em ambos os resultados, em todos os grupos experimentais estudados a quantidade de hemócitos diminuiu em relação ao controle. Essa diminuição observada nos indivíduos expostos ao FPF, mostrou que concentrações utilizadas em campo desse agrotóxico impacta negativamente essas abelhas. Como os hemócitos

compartilham uma estreita conexão com o sistema nervoso (Malagoli et al., 2015), essa ligação entre esses dois sistemas é conhecida a partir de uma ampla gama de sistemas invertebrados, com hemócitos sendo ativamente envolvidos na neurogênese e neuroregeneração (Chaves da Silva, Santos de Abreu, Cavalcante, Monteiro de Barros, & Allodi, 2015; Corley & Lavina, 2006). Sendo o ingrediente ativo um agonista de acetilcolina e os hemócitos estarem ligados ao sistema nervoso, podemos corroborar os dados encontrados, pois essa estreita conexão entre os dois tipos de tecidos funcionalmente distintos apresenta uma possível explicação para o porquê de os hemócitos serem particularmente suscetíveis aos efeitos neurotóxicos dos agrotóxicos. Os hemócitos expressam uma ampla gama de receptores de hormônios e neurotransmissores, incluindo as subunidades do receptor nAChR (Pamminger et al., 2017; Shi et al., 2012; Xu et al., 2016).

Consequentemente, quando expostas a agrotóxicos por via oral ou contato, as moléculas de agrotóxicos são rapidamente absorvidas pelo organismo e entram em contato com a hemolinfa, passando pelo corpo gorduroso, vasos dorsais e, por fim, pelo cérebro. Portanto, quando os inseticidas agonistas da acetilcolina afetam as células da hemolinfa ou do corpo adiposo, o metabolismo dos compostos tóxicos pode ser afetado e atingir o cérebro da abelha. Assim, os indivíduos podem morrer de hiperexcitabilidade, pois inseticidas como o FPF funcionam ligando-se aos receptores nicotínicos nos neurônios pós-sinápticos, mas como não são reconhecidos pela acetilcolinesterase, a ligação não é degradada, resultando na passagem persistente dos impulsos nervosos (Tomizawa et al., 1995; Cruz-Landim, 2009; Chapman, 2013).

Segundo Marringa et al. (2014), a quantidade de hemócitos reflete na capacidade de respostas das abelhas, sendo assim, nossos resultados podem ser um indício de respostas a fatores estressores. De acordo com Brandt et al. (2017), abelhas rainhas jovens expostas a tiacloprido e clotianidina apresentam redução significativa no número total de hemócitos e proporção de hemócitos diferenciados ativos. Além disso, os aspectos funcionais da defesa imunológica, principalmente a resposta de cicatrização/melanização de feridas, bem como a atividade antimicrobiana da hemolinfa são prejudicados. Com isso foi demonstrado que os agrotóxicos podem afetar negativamente a imunocompetência das abelhas, possivelmente prejudicando a capacidade de resistência delas.

Outro indicativo que temos nesse trabalho é de que houve diferentes respostas entre as espécies de abelhas, inferindo uma sensibilidade entre elas. O mecanismo exato

envolvido na diminuição do número total de hemócitos observado em abelhas expostas às concentrações de realistas de campo do FPF (7,7 ng i.a./ μ L e 0,77 ng i.a./ μ L e) permanece desconhecido. Alterações nas populações de hemócitos em abelhas provavelmente refletem suas respostas fisiológicas a fatores de estresse (Marringa et al., 2014; Pandey e Tiwari, 2012), como seria o caso do estresse químico induzido por esse inseticida.

Encontramos também uma diferença entre a quantidade de hemócitos nas diferentes fases estudadas, sendo que as larvas possuem cerca de 3x mais hemócitos que as recém-emergidas. É sabido que o estágio de desenvolvimento das abelhas afeta a quantidade de hemócitos circulantes na hemolinfa havendo uma redução no número de hemócitos com o aumento da idade (Schmid et al., 2008; Butolo et al., 2021). Esse fato foi associado a substituição da defesa celular pela defesa humoral, como forma de redução do gasto energético para colônia. A hipótese de substituição da defesa celular também se justifica pelo fato das abelhas adultas (forrageiras) possuírem uma quantidade muito maior de fenoloxidase, uma enzima responsável pela oxidação da hemolinfa, do que as abelhas mais jovens (Chan et al., 2006). Já as abelhas recém-emergidas, sua quantidade de hemócitos pode ser justificada pelo fato delas possuírem grandes quantidades de corpo gorduroso, que produzem peptídeos antipatogênicos (Wilson-Rich et al., 2008).

Negri e colaboradores (2014) afirmaram que a atividade dos hemócitos de abelhas adultas, ao serem avaliadas individualmente são diferentes das atividades das células de larvas, porém, alegam que a atividade multicelular, ou seja, atividade realizada por diversas células, como o encapsulamento ou nodulação, são iguais em ambos os estágios de desenvolvimento.

Dado que muitas funções imunológicas vitais de insetos provavelmente dependem de populações de hemócitos derivados de larvas para proteção contra patógenos (Evans & Wood, 2011) e que a capacidade de gerar hemócitos durante o estágio de pupa e adulto é provavelmente limitada, uma interrupção durante esses estágios críticos as janelas de desenvolvimento terão efeitos duradouros e potencialmente irreversíveis sobre a imunocompetência do adulto.

Além de sua função central no sistema imune inato, os hemócitos são vitais durante um segundo processo crítico de desenvolvimento em invertebrados: a metamorfose (Truman & Riddiford, 1999). Os hemócitos desempenham papéis vitais nessa fase, estando envolvidos na própria reestruturação funcional (Kurata, Saito, & Natori, 1992), e na limpeza dos remanescentes dessas células apoptóticas (Sonnenfeld &

Jacobs, 1995). Sua falha em fazer isso pode resultar em um acúmulo de material celular em decomposição nas pupas (Sonnenfeld & Jacobs, 1995). Consequentemente, a interrupção da proliferação, maturação e migração de hemócitos por agrotóxicos durante os estágios iniciais de desenvolvimento pode não apenas prejudicar diretamente as funções imunológicas, mas também retardar os efeitos de longo prazo durante a metamorfose.

Diante disso, o IBAMA e outros pesquisadores ressaltam a necessidade de estudos ecotoxicológicos que utilizem diferentes abordagens, como avaliar o perfil de atividade enzimática para abelhas não-Apis (Boyle et al., 2019; Cham et al., 2018; IBAMA, 2017). Este estudo mostra um claro impacto dos agrotóxicos em concentrações realistas de campo no sistema imune em larvas e abelhas recém-emergidas. Sendo a investigação da imunocompetência uma importante ferramenta de avaliação para respostas celulares. O trabalho também trouxe uma importante abordagem comparativa de sensibilidade/toxicidade entre espécies e em idades diferentes. Sendo assim, esse trabalho poderá auxiliar em lacunas de conhecimento sobre a sensibilidade de abelhas sem ferrão expostas a inseticidas.

4. Conclusão

Este é o primeiro estudo a relatar os efeitos de FPF em duas espécies de abelhas sem ferrão com abordagem comparativa a abelhas africanizadas, durante a fase de desenvolvimento e com indivíduos recém-emergidos. A contagem de hemócitos claramente indicou que houve diferentes respostas entre as espécies de abelhas, inferindo uma sensibilidade distinta entre elas. Dessa forma, estudos como esse demonstra grande potencial para contribuir em futuras decisões de órgãos regulatórios para análise de risco. Ao mesmo tempo, os resultados aqui apresentados encorajam o desenvolvimento de novos estudos com foco em abelhas sem ferrão, pois os dados obtidos para *A. mellifera* não podem ser extrapolados para outras espécies de abelhas, incluindo *M. scutellaris* e *S. postica*.

5. Referências

ADAMO, Shelley A. The effects of stress hormones on immune function may be vital for the adaptive reconfiguration of the immune system during fight-or-flight behavior. 2014.

ADAMO, Shelley A. The effects of the stress response on immune function in invertebrates: an evolutionary perspective on an ancient connection. *Hormones and behavior*, v. 62, n. 3, p. 324-330, 2012.

AL NAGGAR, Yahya; BAER, Boris. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

ALAU, Cédric et al. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology*, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 774–782, 2010. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02123.x.

ARMSTRONG, Peter B.; MELCHIOR, Ralph; QUIGLEY, James P. Humoral immunity in long-lived arthropods. *Journal of insect physiology*, v. 42, n. 1, p. 53-64, 1996.

AUPINEL, Pierrick et al. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of insectology*, v. 58, n. 2, p. 107, 2005.

AUPINEL, Pierrick et al. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honey bee brood (*Apis mellifera*), using a new in vitro standardized feeding method. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, v. 63, n. 11, p. 1090-1094, 2007.

BOYLE, Natalie K. et al. Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. *Environmental entomology*, v. 48, n. 1, p. 4-11, 2019.

BRANDT, A. et al. Immunosuppression in honeybee queens by the neonicotinoids thiacloprid and clothianidin. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 4673, 2017.

BRANDT, Annely et al. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of insect physiology*, v. 86, p. 40-47, 2016.

BUTOLO, N. P.; AZEVEDO, P.; ALENCAR, L. D.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Impact of low temperatures on the immune system of honeybees. *Journal of Thermal Biology*, [S. l.], v. 101, n. September, p. 103082, 2021. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2021.103082.

CHAKRABARTI, Priyadarshini et al. Field rates of Sivanto™(flupyradifurone) and Transform®(sulfoxaflor) increase oxidative stress and induce apoptosis in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Plos one*, v. 15, n. 5, p. e0233033, 2020.

CHAM, K. D. O., REBELO, R. M., OLIVEIRA, R. D. P., FERRO, A. A., VIANA-SILVA, F. D. C., BORGES, L. D. O., ... & MACEDO, T. C. Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília: Ibama/Diqua, 105. (2017).

CHAN, Q.W.T.; HOWES, C.G.; FOSTER, L.J. Quantitative comparison of caste

CHAN, Queenie WT et al. The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *BMC genomics*, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2009.

CHAPMAN, Reginald Frederick. The insects: structure and function. Cambridge university press, [S. l.], 2013.

DA CRUZ LANDIM, Carmina. Abelhas. Unesp, 2009.

DA SILVA, PG Chaves et al. Role of hemocytes in invertebrate adult neurogenesis and brain repair. *Invertebrate Survival Journal*, v. 12, n. 1, p. 142-154, 2015.

DAVID, Arthur; BOTÍAS, Cristina; ABDUL-SADA, Alaa; GOULSON, Dave; HILL, Elizabeth M. Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, [S. l.], v. 407, p. 26, 2015. DOI: 10.1007/s00216-015-8986-6.

DECOURTYE, Axel et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 57, n. 3, p. 410-419, 2004.

DEMAS, Gregory E.; ADAMO, Shelley A.; FRENCH, Susannah S. Neuroendocrine-immune crosstalk in vertebrates and invertebrates: implications for host defence. *Functional Ecology*, v. 25, n. 1, p. 29-39, 2011.

differences in honeybee hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 5, n. 12, p. 2252-2262, 2006.

DOMINGUES, Caio EC et al. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrocytic system of the Africanized honeybee. *Chemosphere*, v. 186, p. 994-1005, 2017.

DORIGO AS, ROSA-FONTANA AS, SOARES-LIMA HM, GALASCHI-TEIXEIRA JS, NOCELLI RCF, MALASPINA O. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PloS one*. 2019; 14(3): e0213109. doi: 10.1371/journal.pone.0213109

EVANS, Iwan Robert; WOOD, Will. *Drosophila* embryonic hemocytes. *Current Biology*, v. 21, n. 5, p. R173-R174, 2011.

EVANS, J. D. et al. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect molecular biology* 15, 645–656, doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x (2006).

EVERETT, Jim AC. The 12 item social and economic conservatism scale (SECS). *PloS one*, v. 8, n. 12, p. e82131, 2013.

FLATT, Thomas et al. Hormonal regulation of the humoral innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, v. 211, n. 16, p. 2712-2724, 2008.

GARRIDO, P.M. et al. Immune-related gene expression in nurse honey bees (*Apis mellifera*) exposed to synthetic acaricides. *Journal of Insect Physiology*, v.59, n. 1, p.113-119, 2013.

GILLESPIE, J.P.; KANOST, M.R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*, v. 42, n. 1, p. 611-643, 1997.

GILLIAM, M.; SHIMANUKI, H. In vitro phagocytosis of *Nosema apis* spores by honeybee hemocytes. *Journal of invertebrate pathology*, v. 9, n. 3, p. 387-389, 1967.

GOULSON, Dave et al. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, v. 347, n. 6229, p. 1255-1257, 2015.

GRAAF, D. CD, DAUWE, R., WALRAVENS, K. & JACOBS, F. J. Flow cytometric analysis of lectin-stained haemocytes of the honeybee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 33, 571–579 (2002).

GUPTA, A.P. Cellular elements in the hemolymph. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, v. 3, p. 402-451, 1985.

HADDON, Catherine; LEWIS, Julian. Early ear development in the embryo of the zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Comparative Neurology*, v. 365, n. 1, p. 113-128, 1996.

HELMER, S.H., KERBAOL, A., ARAS, P. et al. Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ Sci Pollut Res* 22, 8010–8021 (2015). <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2879-7>

HESSELBACH, Hannah et al. Chronic exposure to the pesticide flupyradifurone can lead to premature onset of foraging in honeybees *Apis mellifera*. *Journal of Applied Ecology*, v. 57, n. 3, p. 609-618, 2020.

HESELBACH, Hannah; SCHEINER, Ricarda. Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

HESELBACH, Hannah; SCHEINER, Ricarda. The novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) affects honeybee motor abilities. *Ecotoxicology*, v. 28, n. 3, p. 354-366, 2019.

JONES, Julia C.; OLDROYD, Benjamin P. Nest thermoregulation in social insects. *Advances in insect physiology*, v. 33, p. 153-191, 2006.

KAVANAGH, Kevin; REEVES, Emer P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews*, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.

KOBAYASHI, Hideshi et al. Ecological adaptation of angiotensin-induced thirst mechanism in tetrapods. *General and comparative endocrinology*, v. 38, n. 1, p. 93-104, 1979.

KRAUTZ, Robert; AREFIN, Badrul; THEOPOLD, Ulrich. Damage signals in the insect immune response. *Frontiers in plant science*, p. 342, 2014.

KURATA, Shoichiro; SAITO, Hiromi; NATORI, Shunji. The 29-kDa hemocyte proteinase dissociates fat body at metamorphosis of *Sarcophaga*. *Developmental biology*, v. 153, n. 1, p. 115-121, 1992.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

MALAGOLI, Davide et al. Circulating phagocytes: the ancient and conserved interface between immune and neuroendocrine function. *Biological Reviews*, v. 92, n. 1, p. 369-377, 2017.

MARRINGA, William J. et al. Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. *PloS one*, v. 9, n. 10, p. e108486, 2014.

MARRINGA, William J. et al. Honey bee hemocyte profiling by flow cytometry. *PloS one*, v. 9, n. 10, p. e108486, 2014.

MASON, Rosemary et al. Immune suppression by neonicotinoid insecticides at the root of global wildlife declines. *Journal of environmental immunology and toxicology*, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2013.

MEUNIER, Joël. Social immunity and the evolution of group living in insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 370, n. 1669, p. 20140102, 2015.

NEGRI, Pedro et al. *Apis mellifera* haemocytes in-vitro, What type of cells are they? Functional analysis before and after pupal metamorphosis. *Journal of Apicultural Research*, v. 53, n. 5, p. 576-589, 2014.

NEGRI, Pedro et al. Cellular immunity in *Apis mellifera*: studying hemocytes brings light about bees skills to confront threats. *Apidologie*, v. 47, n. 3, p. 379-388, 2016.

PAGE JR, Robert E.; PENG, Christine Y.-S. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental gerontology*, v. 36, n. 4-6, p. 695-711, 2001.

PAMMINGER, Tobias et al. First indication of acetylcholine-based communication in honeybee haemocytes and its modulation by a neonicotinoid insecticide. *bioRxiv*, p. 105700, 2017.

PETTIS, Jeffery S.; LICHTENBERG, Elinor M.; ANDREE, Michael; STITZINGER, Jennie; ROSE, Robyn; VANENGELSDORP, Dennis. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. *Plos One*, [S. l.], v. 8, n. 7, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0070182.

POTTS, Simon G. et al. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. 2016.

QI, Yi-xiang et al. Serotonin modulates insect hemocyte phagocytosis via two different serotonin receptors. *Elife*, v. 5, p. e12241, 2016.

RACHMI, Cut Novianti et al. Stunting, underweight and overweight in children aged 2.0–4.9 years in Indonesia: prevalence trends and associated risk factors. *PloS one*, v. 11, n. 5, p. e0154756, 2016.

ROLFF, Jens; SIVA-JOTHY, Michael T. Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 15, p. 9916-9918, 2002.

RONDEAU, Gary et al. Delayed and time-cumulative toxicity of imidacloprid in bees, ants and termites. *Scientific reports*, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2014.

ROSA-FONTANA, Annelise et al. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. *Environmental Pollution*, v. 265, p. 114849, 2020.

RUS, Florentina et al. Ecdysone triggered PGRP-LC expression controls *Drosophila* innate immunity. *The EMBO journal*, v. 32, n. 11, p. 1626-1638, 2013.

SCHMID-HEMPEL, Paul. *Evolutionary parasitology: the integrated study of infections, immunology, ecology, and genetics*. Oxford University Press, 2021.

SCHMID, Martin R. et al. Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of insect physiology*, v. 54, n. 2, p. 439-444, 2008.

SIVITER, Harry et al. Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. *Nature*, v. 596, n. 7872, p. 389-392, 2021.

SIVITER, Harry et al. Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *Journal of Applied Ecology*, v. 55, n. 6, p. 2812-2821, 2018.

SNODGRASS, Robert E. *Anatomy of the honey bee*. Cornell University Press, 1956.

STEFANO, George B. et al. Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 2, p. 626-630, 1989.

STEFANO, George B.; CADET, Patrick; SCHARRER, Berta. Stimulatory effects of opioid neuropeptides on locomotory activity and conformational changes in invertebrate and human immunocytes: evidence for a subtype of delta receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 16, p. 6307-6311, 1989.

TAN, Bee Ling; NORHAIZAN, Mohd Esa. Scientific evidence of rice by-products for cancer prevention: chemopreventive properties of waste products from rice milling on carcinogenesis in vitro and in vivo. *BioMed research international*, v. 2017, 2017.

TAVARES, D.A. et al. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. *Environmental pollution*, v. 229, p. 386-393, 2017.

TOMIZAWA, Motohiro; OTSUKA, Hiroko; MIYAMOTO, Toru; YAMAMOTO, Izuru; ELDEFRAWI, Mohyee E. Pharmacological Characteristics of Insect Nicotinic Acetylcholine Receptor with Its Ion Channel and the Comparison of the Effect of Nicotinoids and Neonicotinoids. *Journal of Pesticide Science*, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 57–64, 1995. DOI: 10.1584/jpestics.20.57.

TONG, Linda; NIEH, James C.; TOSI, Simone. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. *Chemosphere*, v. 237, p. 124408, 2019.

TOSI, Simone; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 286, n. 1900, p. 20190433, 2019.

TOSI, Simone; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 286, n. 1900, p. 20190433, 2019.

TRUMAN, James W.; RIDDIFORD, Lynn M. The origins of insect metamorphosis. *Nature*, v. 401, n. 6752, p. 447-452, 1999.

VANBERGEN, Adam J.; INITIATIVE, the Insect Pollinators. Threats to an ecosystem service: pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 11, n. 5, p. 251-259, 2013.

WILLIAMS, Neal M. et al. Ecological and life-history traits predict bee species responses to environmental disturbances. *Biological Conservation*, v. 143, n. 10, p. 2280-2291, 2010.

WILSON-RICH, N.; DRES, S.T.; STARKS, P.T. The ontogeny of immunity: development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of insect physiology*, v. 54, n. 10-11, p. 1392-1399, 2008.

XU, Gang et al. Molecular characterization and expression profiles of nicotinic acetylcholine receptors in the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect science*, v. 24, n. 3, p. 371-384, 2017.

Considerações finais

Com base nos resultados obtidos por meio do presente estudo, pode-se concluir que:

- Os resultados fornecem dados essenciais para caracterizar os riscos da exposição das abelhas sem ferrão ao inseticida flupiradifurona;
- Concentrações/Doses realistas de campo de flupiradifurona podem afetar o desenvolvimento das espécies estudadas;
- Os efeitos da exposição ao agrotóxico FPF, como redução da sobrevivência e atrasos no desenvolvimento, podem contribuir para o declínio da colônia ao longo do tempo.
- Os biomarcadores de enzimas metabólicas, antioxidantes e de desintoxicação aqui utilizados, demonstraram sua eficácia na identificação de efeitos subletais, apontando diferentes respostas da exposição para as espécies de abelhas analisadas.
- Os estudos apresentados nesta tese demonstraram que há diferentes respostas imunológicas entre as espécies de abelhas estudadas, inferindo uma sensibilidade distinta entre elas, reforçando que os dados obtidos para *A. mellifera* não podem ser extrapolados para outras espécies de abelhas;
- Mesmo sendo considerado um agrotóxico seguro para abelhas, o flupiradifurona demonstrou que necessita de atenção dos órgãos regulatórios;
- Enfatizamos que espécies sem ferrão possam ser utilizadas como modelo experimental para avaliação de risco, contribuindo para a geração de informações adequadas para subsidiar estratégias de conservação dessas espécies.