

---

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

---

# Parâmetros biológicos de abelhas sem ferrão e protocolo para criação larval *in vitro* de *Melipona scutellaris*

**Adna Suelen Dorigo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro  
2018**

ADNA SUELEN DORIGO

Parâmetros biológicos de abelhas sem ferrão e protocolo para criação larval *in vitro* de *Melipona scutellaris*

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Roberta C. Ferreira Nocelli

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Annelise de Souza Rosa-Fontana

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro**  
**2018**

595.799 Dorigo, Adna Suelen  
D697p Parâmetros biológicos de abelhas sem ferrão e protocolo  
para criação larval in vitro de *Melipona scutellaris* / Adna  
Suelen Dorigo. - Rio Claro, 2018  
66 f. : il., figs., gráfs., tabs.

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

1. Abelha. 2. Desenvolvimento. 3. Método. 4.  
Padronização. 5. Análise de risco. 6. Agrotóxico. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Parâmetros biológicos de abelhas sem ferrão e protocolo para criação larval in vitro de *Melipona scutellaris*

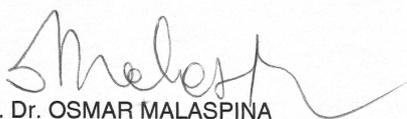
**AUTORA:** ADNA SUELEN DORIGO

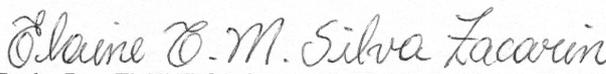
**ORIENTADOR:** OSMAR MALASPINA

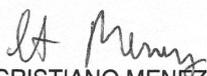
**COORIENTADORA:** ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

**COORIENTADORA:** ANNELISE DE SOUZA ROSA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. OSMAR MALASPINA  
CEIS / IB Rio Claro

  
Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN  
Departamento de Biologia / UFSCar - Sorocaba

  
Dr. CRISTIANO MENEZES  
x / EMBRAPA

Rio Claro, 06 de março de 2018

*Dedico aos meus pais, Jesuel e Ivanil  
e a minha irmã, Lilian, por me apoiarem sempre.*

## 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;

À minha irmã, 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 co-orientadora Profa. Dra. Roberta pela oportunidade, amizade, incentivo, dedicação, paciência e atenção prestados;

A minha co-orientadora e amiga Dra. Annelise pela amizade, orientação, ajuda, paciência e conselhos sempre úteis quando eu estava em dúvida de qual caminho seguir. Obrigada pela amizade e companheirismo!;

Aos meus avós Luzia (*in memoriam*), Leonildo (*in memoriam*) e Alzira (*in memoriam*) por todo pelo carinho e bondade imensuráveis;

A todos os meus familiares, pelo apoio e por todos os momentos especiais que pudemos compartilhar;

À Hellen por toda sua ajuda desde minha graduação e principalmente agora com a temida estatística.

À minha amiga Mirian, por sua amizade de anos, sempre me incentivando e torcendo por mim;

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

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro;

A todos do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), principalmente Isabella e Tatiane, por todo auxílio, disponibilidade e amizade;

Ao técnico Sérgio Pascon por todos seus ensinamentos.

À Necis Mirando por me socorrer sempre que precisei.

A Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela concessão de espaço para execução dessa pesquisa.

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

“ O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

*José de Alencar*

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Introdução Geral</b>   | <b>12</b> |
| <b>Objetivos e organização geral da dissertação</b>   | <b>18</b> |
| <b>Referências</b>  | <b>19</b> |
| <b>Capítulo 1 - Biological Data of Stingless Bees with Potential Application in Pesticide Risk Assessments</b>            |           |
| <b>Introdução</b>   | <b>25</b> |
| <b>Materiais e métodos</b>  | <b>25</b> |
| <b>Resultados</b>   | <b>26</b> |
| <b>Discussão</b>  | <b>26</b> |
| <b>Agradecimentos</b>   | <b>28</b> |
| <b>Referências</b>  | <b>28</b> |
| <b>Capítulo 2 – Protocolo de criação larval <i>in vitro</i> de <i>Melipona scutellaris</i> para estudos toxicológicos</b> |           |
| <b>Introdução</b>   | <b>30</b> |
| <b>Objetivos</b>  |           |
| <b>Objetivo geral</b>   | <b>36</b> |
| <b>Objetivos específicos</b>  | <b>36</b> |
| <b>Materiais e métodos</b>  |           |
| <b>Procedimentos precedentes aos bioensaios <i>in vitro</i></b>   | <b>37</b> |
| <b>Descrição do protocolo proposto</b>  | <b>37</b> |
| <b>Verificação dos parâmetros estabelecidos</b>   | <b>41</b> |
| <b>Análises morfométricas</b>   | <b>41</b> |
| <b>Análises histológicas</b>  | <b>43</b> |
| <b>Determinação da CL<sub>50</sub> do inseticida dimetoato</b>  | <b>44</b> |
| <b>Análises estatísticas</b>  | <b>45</b> |
| <b>Resultados</b>   |           |
| <b>Desenvolvimento</b>  | <b>47</b> |
| <b>Morfologia</b>   | <b>49</b> |
| <b>CL<sub>50</sub> Dimetoato</b>  | <b>52</b> |
| <b>Discussão</b>  | <b>53</b> |
| <b>Conclusão</b>  | <b>59</b> |
| <b>Referências</b>  | <b>60</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema (A) e foto (B) do cérebro de abelha *Melipona scutellaris*. **Pág. 33**
- Figura 2:** Placa de acrílico utilizada para bioensaios larvais. **Pág. 37**
- Figura 3:** Representação das fases experimentais da criação *in vitro* de abelhas da espécie *Melipona scutellaris*. (A) Coleta de favos na caixa racional. (B) Preparação do ambiente para transferência. (C) e (D) Distribuição de alimento nas placas de acrílico. **Pág. 40**
- Figura 4:** Representação das fases experimentais da criação *in vitro* de abelhas da espécie *Melipona scutellaris*. (A) Desoperculação do favo. (B) e (C) Transferência das larvas. (D) Acréscimo de água destilada à placa de Petri. (E) Larvas transferidas. (F) Experimento em andamento. **Pág. 40**
- Figura 5:** Largura da cabeça e distância intertegular de operárias de *M. scutellaris* criadas *in vitro* e *in vivo*. (A) abelha emergida *in vitro*. (B) abelha emergida *in vivo*. Valores dentro dos retângulos indicam as médias das medidas morfométricas. **Pág. 42**
- Figura 6:** Marcos anatômicos das junções das nervuras das asas de operárias de *Melipona scutellaris* com 24h de emergidas. **Pág. 43**
- Figura 7:** Cascata de Diluição utilizada para a determinação da CL<sub>50</sub> do inseticida dimetoato. **Pág. 45**
- Figura 8:** Fases larvais do desenvolvimento de operárias de *Melipona scutellaris*. (A) Ovo; (B) Larva com 24h após a eclosão. **Pág. 48**
- Figura 9:** Fases de pupas do desenvolvimento de operárias de *Melipona scutellaris*. (A) Pupa de olho branco; (B) Pupa de olho rosa; (C) Pupa de olho marrom; (D) Pupa de olho preto. **Pág. 49**
- Figura 10:** Medidas morfométricas (média em milímetros) de operárias de *Melipona scutellaris* criadas *in vitro* e *in vivo*. **Pág. 49**
- Figura 11:** Cérebro de *Melipona scutellaris* recém-emergida criada *in vitro* e *in vivo*. (A; B e C) Corpo pedunculado de abelhas emergidas *in vitro* provenientes de 3 colônias diferentes. (D; E e F) Corpo pedunculado de abelhas emergidas *in vivo* provenientes de 3 colônias diferentes. **Pág. 51**
- Figura 12:** Toxicidade oral do inseticida dimetoato para larvas de *Melipona scutellaris*. **Pág. 52**
- Figura 13:** Forma discoidal do favo de cria de *Melipona scutellaris*. **Pág. 55**

## RESUMO:

O atual cenário de uso intensivo de agrotóxicos no Brasil em áreas agrícolas que ofertam flores atrativas a abelhas requer informações biológicas sobre abelhas sem ferrão brasileiras bem como o desenvolvimento de testes que possam ser utilizados para estudos de avaliação de risco de abelhas sem ferrão durante o estágio imaturo, a fim de que órgãos públicos responsáveis pela segurança ambiental façam uso para fins de cálculos em avaliações de risco. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos: (i) apresentar dados biológicos de abelhas sem ferrão e (ii) desenvolver um protocolo de criação larval *in vitro* de *Melipona scutellaris*. Para tanto, (i) favos de cria e operárias adultas de *M. scutellaris*, *Scaptotrigona postica* e *Tetragonisca angustula* foram avaliados quanto ao alimento consumido por larvas ( $\mu\text{L}$  e  $\text{mg}$ ) e por adultas ( $\text{mg}$ ) e verificou-se também a massa corporal ( $\text{mg}$ ) de operárias forrageiras e; (ii) propôs-se um método de criação larval de *M. scutellaris*, testando-se quatro vezes experimentos *in vitro* de maneira sequencial, avaliando-se parâmetros como taxa de defecação, pupação, emergência e mortalidade e morfometria de operárias recém emergidas. (i) Os valores médios, seguidos de seus desvios padrão, do (a) volume e da (b) massa de alimento larval por célula de cria, do (c) consumo diário de xarope e da (d) massa corporal individual por operária forrageira foram, nesta ordem, *M. scutellaris*: (a)  $130.58 \pm 0.52$ , (b)  $158.04 \pm 5.18$ , (c)  $35.06 \pm 9.15$  e (d)  $76.65 \pm 2.9$ ; *S. postica*: (a)  $25 \pm 1.14$ , (b)  $32.5 \pm 0.8$ , (c)  $9.45 \pm 2.41$  e (d)  $17.02 \pm 0.35$  e; *T. angustula*: (a)  $5.6 \pm 0.77$ , (b)  $7.96 \pm 1.03$ , (c)  $7.23 \pm 1.74$  e (d)  $4.1 \pm 0.37$ . (ii) As taxas de emergência/larvas, de emergência/pupas e mortalidade/larvas foram, em média, de 80,2%, 92,61% e 7,42% nos bioensaios, respectivamente. As análises histológicas e morfométricas indicaram operárias emergidas *in vitro* com os parâmetros avaliados similares às *in vivo*. Os resultados fornecem subsídios essenciais para a caracterização dos riscos de exposição de abelhas sem ferrão a agrotóxicos. Os dados da quantidade de alimento consumido por larva e de xarope por operária forrageira e massa corporal de indivíduos adultos, combinados com informações sobre as

concentrações destas substâncias em culturas agrícolas que ofertam flores atrativas para abelhas, poderão ser utilizadas para cálculos de risco. Somado a isso, o protocolo de criação *in vitro* desenvolvido apresentou uma taxa de emergência muito satisfatória, corroborando estudos prévios com outras espécies de abelhas sem ferrão, bem como produziu operárias recém emergidas com parâmetros semelhantes àquelas provenientes de condições naturais, possibilitando, dessa forma, sua utilização em testes de toxicidade.

**Palavras-chave:** agrotóxicos, análise de risco, método *in vitro*, polinizadores.

## ABSTRACT:

The current scenario of intensive use of pesticides in Brazil on crops which offer attractive flowers to bees requires biological information about Brazilian native bees, as well as the development of tests which may be used for assessment risks studies on stingless bees during their immature phase, in order to public authorities responsible for environmental safety use them for calculations on risk assessments. Thus, the present study aimed: (i) to show biological data of stingless bees and (ii) to develop an *in vitro* larval rearing protocol of *Melipona scutellaris*. For this, (i) the food consumed by larvae ( $\mu\text{L}$  e  $\text{mg}$ ) and by adults ( $\text{mg}$ ) and the body mass ( $\text{mg}$ ) of forager workers of *M. scutellaris*, *Scaptotrigona postica* and *Tetragonisca angustula* were assessed and; (ii) it was developed a larval rearing protocol of *M. scutellaris*, testing four times sequentially the *in vitro* experiments, evaluating parameters as defecation rate, pupation, emergence, and mortality and morphometry of newly emerged workers. (i) The mean values, followed by standards deviation, of (a) volume and of (b) mass of larval food by brood cell, of (c) syrup daily consumption and of (d) individual body mass by forager worker were, in this sequence, *M. scutellaris*: (a)  $130.58 \pm 0.52$ , (b)  $158.04 \pm 5.18$ , (c)  $35.06 \pm 9.15$  and (d)  $76.65 \pm 2.9$ ; *S. postica*: (a)  $25 \pm 1.14$ , (b)  $32.5 \pm 0.8$ , (c)  $9.45 \pm 2.41$  and (d)  $17.02 \pm 0.35$  e; *T. angustula*: (a)  $5.6 \pm 0.77$ , (b)  $7.96 \pm 1.03$ , (c)  $7.23 \pm 1.74$  and (d)  $4.1 \pm 0.37$ . (ii) The emergence/larva, emergence/pupa and mortality/larvae rates were an average of 80.2%, 92,61% e 7,42% on bioassays, respectively. The histological and morphometric analyzes indicated newly emerged workers *in vitro* with the patterns assessed similar to *in vivo*. The results provide essential subsidies for the characterization of the risks of exposure of stingless bees to pesticides. The amount of food consumed by larvae and syrup by forager workers and the body mass of adult individual's data, combined with information about the concentrations of these substances on crops which offer attractive flowers for bees, may be

used for risk calculations. In addition, the *in vitro* rearing protocol developed showed a satisfactory emergence rate, corroborating previous studies with other species of stingless bees, as well as produced newly emerged workers with similar patterns to those from natural conditions, allowing its use in toxicity tests.

**Keywords:** Agrochemicals, *in vitro* method, risk analysis, pollinators.

## INTRODUÇÃO GERAL

O processo de fecundação das angiospermas tem seu início com a formação dos grãos de pólen e dos óvulos nas flores, e então, ocorre a polinização. O ato consiste na transferência dos grãos de pólen, localizados nas anteras, para o estigma da mesma flor (autopolinização), para flores diferentes da mesma planta (geitonogamia), ou para flores diferentes de plantas diferentes (xenogamia ou polinização cruzada). As anteras representam a parte sexual masculina das flores e o estigma, área receptiva dos grãos de pólen, representa a parte sexual feminina (DELAPLANE et al., 2013). A polinização permite a união entre os gametas, sendo que, é considerada parte indispensável para o processo reprodutivo das plantas com flores, sendo o processo de polinização cruzada o mais eficiente dentre todos, por possibilitar a variabilidade genética entre as plantas (SOUZA, 2009).

O sucesso reprodutivo da maioria das angiospermas, considerando sistemas agrícolas e naturais, necessita mais da polinização do que de outros fatores, como: condições climáticas e fertilidade do solo, sendo assim, a polinização é considerada um serviço imprescindível (NABHAN; BUCHMANN, 1997). Além disso, a polinização ocorre a partir de agentes, que são classificados como bióticos e abióticos. Os agentes abióticos (sem vida) são a água e o vento, já os agentes bióticos (apresentam vida) estão sujeitos a usar os recursos fornecidos pelas plantas ao longo de todo seu ciclo de vida como forma de alimento (BIESMEIJER et al., 2006).

A polinização biótica ocorre por intermédio de aves, mamíferos e insetos, entretanto, os insetos se sobressaem ao desempenhar essa função. Estima-se que 352 mil espécies de angiospermas necessitam dos serviços ecossistêmicos prestados pelos agentes polinizadores e, cerca de 308 mil espécies de plantas com flores mantêm relação de dependência com estes agentes, representando então 87,5% de todas as espécies vegetais (OLLERTON et al., 2011).

As abelhas representam o grupo mais importante de agentes polinizadores, pois se comparadas com outros agentes, realizam a polinização de mais espécies de plantas do que

qualquer outro grupo. Na verdade, em termos evolutivos, as abelhas e plantas florísticas diversificaram-se juntas ao longo dos últimos 80 milhões de anos, portanto, as abelhas desenvolveram partes bucais, corbícula, cerdas no corpo e outros apêndices com adaptações para transportar pólen e néctar. Em contrapartida, as flores desenvolveram atrativos para as abelhas, como cores nas pétalas e odores, além de recompensas como o pólen das flores, rico em proteínas e o néctar, fonte de açúcares (IMPERATRIZ-FONSECA, 2006).

A perpetuação das espécies vegetais, via reprodução sexuada, se dá principalmente pela polinização. Caso não ocorra polinização das espécies florísticas, ocorre 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. Isso acaba atingindo também a fauna dependente de seus produtos, gerando desequilíbrio ecológico, alterações no solo e nos regimes de águas (KERR et al., 2001; KEVAN, 2002; NOCELLI et al., 2012).

Outro viés dessa dependência entre planta e polinizador foi expressado pela Plataforma Intergovernamental de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos - IPBES (2016), a qual foi evidenciou que 75% da alimentação humana depende direta ou indiretamente de plantas polinizadas por agentes bióticos, principalmente abelhas. Portanto, se considerarmos sistemas agrícolas, visando melhoria na produção e na qualidade dos frutos e sementes por intermédio de abelhas como agentes polinizadores, precisamos ter em mente o uso de espécies com ampla distribuição geográfica, além de conhecer e dominar o manejo e multiplicação de ninhos (IMPERATRIZ-FONSECA, 2006).

*Apis mellifera* é uma espécie generalista, que tem a 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; BRITAIN, C; POTTS, 2011). No entanto, esta espécie não é nativa do Brasil, sendo assim, é

válido ressaltar que ao usar esta espécie em áreas de cultivo aumenta-se a competição pela busca de alimentos para as espécies sem ferrão (IBAMA, 2017).

O Brasil, devido às suas proporções continentais e riqueza de ecossistemas, pode ser considerado privilegiado por abrigar cerca de cinco mil espécies de abelhas (PEDRO; CAMARGO, 1999). São encontradas aproximadamente 192 espécies descritas e 33 gêneros de abelhas sem ferrão no Brasil, sendo estas espécies de extrema importância para a manutenção da biodiversidade, pois são responsáveis por aproximadamente 40 – 90% da polinização da vegetação nativa, dependendo do ecossistema considerado (KERR et al., 2001; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002).

Em seu modelo sistemático encontra-se a subfamília Apinae abrangendo dezenove tribos, onde localiza-se a tribo Meliponini. Esta tribo engloba as abelhas chamadas de eussociais, e isso significa que exibem hábitos sociais avançados, contendo uma rainha incumbida pela reprodução e operarias encarregadas por todas as outras tarefas do ninho, como segurança, limpeza, alimentação dos imaturos, potes de mel, construção de favos ou discos de cria, e o forrageamento, que é uma das funções mais importantes para a colônia, pois consiste na busca por pólen, néctar e outros materiais necessários para a dinâmica do ninho (KEER, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; IMPERATRIZ-FONSECA, 2006; MICHENER, 2007).

As abelhas da tribo Meliponini são também conhecidas como abelhas sem ferrão, pelo fato de possuírem ferrão atrofiado. 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).

No contexto da polinização, *Melipona scutellaris*, *Tetragonisca angustula* e *Scaptotrigona postica* se mostram como interessantes espécies a serem utilizadas como

organismos-modelo para diversos estudos brasileiros, uma vez que, além de comporem a fauna nativa, são reconhecidas como polinizadoras efetivas de cultivos agrícolas como berinjela (NUNES-SILVA et al., 2013), maçã (VIANA et al., 2014), morango (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT 2004; ROSELINO et al. 2009), tomate (DEL SARTO et al. 2005), pepino (dos SANTOS et al. 2008) e pimentão (CRUZ et al. 2005).

Além disso, *M. scutellaris*, natural do nordeste do Brasil (NOGUEIRA-NETO, 1997), possui ainda 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 (HEARD, 1999; NUNES-SILVA; HRNCIR; IMPERATRIZ-FONSECA, 2010). Além disso, *M. scutellaris* tem sido reconhecida como potencial polinizador em áreas agrícolas e produtor de mel, pois, apresentam fácil domesticação e manejo devido à ausência de ferrão funcional, e ainda, é uma das três espécies de *Melipona* mais manipuladas pelo homem (NOGUEIRA-NETO, 1997; KEER et al., 2001; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2008).

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

Com a finalidade de aumentar a produção agrícola houve ampliação nas áreas de cultivo e, visando priorizar a quantidade e a qualidade da produção agrícola o uso de agrotóxicos se tornou uma ferramenta recorrente. Além disso, o uso excessivo e indiscriminado destes produtos causa impactos ambientais deixando resíduos no solo, no ar, na água e até mesmo nas plantas (FERNÁNDEZ et al., 2001). Com base nessas informações, é válido evidenciar que a

aplicação destes produtos exibe um grande espectro de ação, ou seja, além de atingir as pragas agrícolas também são capazes de atingir insetos benéficos, como as abelhas, excelentes agentes polinizadores de sistemas naturais e agrícolas (SPADOTTO et al., 2004).

No Brasil, a produção agrícola é basicamente baseada no uso agrotóxicos, sendo que, segundo dados publicados pelo IBGE (2015), entre os anos de 2002 e 2012 o uso de insumos agrícolas mais que dobrou. Houve um salto de 2,7 quilos por hectare em 2002 para 6,9 quilos por hectare em 2012 (IBGE, 2015). Em vista disso, 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).

As abelhas podem entrar em contato com este inseticida via oral, pois quando se trata de um ingrediente ativo sistêmico, ele pode ser translocado pela planta e chegar ao néctar e pólen, assim as abelhas terão contato com ele durante sua alimentação individual (GOULSON, 2013). Outra forma da abelha entrar em contato com esse inseticida é através da aplicação foliar, quando é pulverizado sobre a planta ou através da deriva proveniente da aplicação nas sementes (FAIRBROTHER et al., 2014) ou seja, é um inseticida sistêmico por contato e ingestão (IUPAC, 2015), podendo afetar todos os indivíduos da colônia que se alimentarão desses recursos potencialmente contaminados. Além do inseticida em si, metabólitos destes compostos também já foram encontrados no néctar, no pólen coletado pelas forrageiras e na cera produzida pelas operárias (BLACQUIERE et al., 2012).

Segundo Rotais et al. (2005) a contaminação das abelhas pode ocorrer através do contato direto com os inseticidas durante a pulverização no período de florada, ou quando coletam pólen, néctar e outros recursos florais contaminados com inseticidas e levando posteriormente,

a contaminação das larvas que consomem o alimento larval que será elaborado com os ingredientes que foram estocados no interior da colônia.

Um problema, comumente 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 também são acerca de *A. mellifera*, mas criadores de abelhas sem ferrão (meliponicultores), também têm feito seus registros com suas abelhas. A mortalidade massiva e repentina das abelhas tem sido atribuída, em 80% dos casos, ao uso incorreto de agrotóxicos (MAP, 2016).

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).

Contudo, esse método desenvolvido para larvas de *A. mellifera* não se mostra adequado para ser utilizado e adotado para as abelhas sem ferrão uma vez que os sistemas de alimentação larval diferem entre os grupos: enquanto em *A. mellifera* a alimentação ocorre de forma progressiva, em abelhas sem ferrão ocorre de forma massiva (NOGUEIRA-NETO, 1953; MICHENER 1974; SAKAGAMI, 1982). Além disso, outros fatores também evidenciam as diferenças, a exemplo do tempo de desenvolvimento, condições de umidade relativa do ar e temperatura.

## OBJETIVOS E ORGANIZAÇÃO GERAL DA DISSERTAÇÃO

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) fornecer dados que sirvam para preencher lacunas no conhecimento sobre a biologia de três espécies de abelhas sem ferrão (*M. scutellaris*, *S. postica* e *T. angustula*); (ii) desenvolver um protocolo de criação *in vitro* de larvas da espécie de abelha sem ferrão *M. scutellaris*, que possa vir a ser utilizado/adaptado em bioensaios toxicológicos em abelhas sem ferrão.

A dissertação será apresentada em dois capítulos. O primeiro apresenta parâmetros biológicos como a quantidade de alimento consumida por larvas e operárias forrageiras e a massa corporal de indivíduos adultos das três espécies de abelhas sem ferrão mencionadas acima. Este capítulo já se encontra nas normas do periódico *Sociobiology* para publicação em formato de “Short Note”.

O segundo apresenta um protocolo *in vitro* para criação de larvas de *M. scutellaris*, com potencial para ser utilizado em futuros bioensaios de toxicidade, e será submetido ao periódico *Plos Biology*.

## REFERÊNCIAS

- AUPINEL, P.; FORTINI, D.; DUFOUR, H.; TASEI, J.-N.; MICHAUD, B.; ODOUX, J.-F.; PHAM-DELÈGUE, M. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, v.58, n.2, p.107-111, 2005.
- AUPINEL, P.; FORTINI, D.; MICHAUD, B.; MAROLLEAU, F.; TASEI, J.-N.; ODOUX, J.-N. Toxicity of dimetoate and fenoxycarb to honeybee brood (*Apis mellifera*) using a new in vitro standardized feeding method. **Pest Management Science**, v.63, n.11, p.1090-1094, 2007.
- BIESMEIJER, J. C.; SLAA, E. J. The structure of eusocial bee assemblages in Brazil. **Apidologie**, v. 37, p. 240-258, 2006.
- BRITAIN, C; POTTS, S. G; The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v.12, p.321– 331, 2011.
- DELAPLANE, KEITH S.; VAN DER STEEN, JOZEF; GUZMAN-NOVOA, ERNESTO. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. **Journal of Apicultural Research**, 52.1: 1-12, 2013.
- EVANGELISTA-RODRIGUES, A. et al. Desenvolvimento produtivo de colmeias de abelhas *Melipona scutellaris*. **Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 59–64, 2008.
- FERNÁNDEZ, M.; PADRÓN C.; MARCONI L.; GHINI S.; COLOMBO R.; SABATINI G.; GIROTTI S. Determination of organophosphorus pesticides in honeybees alter solid phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 922, n. 1-2, p. 257-265, jul. 2001.
- GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SATTELE, J.; VAISSIERE, B.E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v.68, n.3, p.810-821, 2009.

HEARD, T. A. the Role of Stingless Bees in Crop Pollination. **Annu. Rev. Entomol**, v. 44, n. 131, p. 183–206, 1999.

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/nota\\_tecnica\\_avaliacao\\_de\\_risco\\_de\\_agrotoxicos.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/noticias2017/nota_tecnica_avaliacao_de_risco_de_agrotoxicos.pdf) > Acessado em 30 Junho 2017

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

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

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

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.

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

MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; SOUZA, T. F. Defesa de apiários e meliponários contra agrotóxicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE

APICULTURA, 18.; CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, 4., 2010, Cuiabá, Anais... Cuiabá: Confederação Brasileira de Apicultura, 2010, 5p.

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

MICHENER, Charles Duncan. *The social behavior of the bees: a comparative study*. Harvard University Press, 1974.

NABHAN, GARY PAUL; BUCHMANN, STEPHEN L. Services provided by pollinators. **Nature's Services: societal dependence on natural ecosystems**, 133-150, 1997.

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

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

NOGUEIRA NETO, Paulo. Criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meliponinae). 1953.

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

NUNES-SILVA, N.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 140–151, 2010.

OECD. Guidelines for testing chemicals. **Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure**, (guidelines) 2013.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321–326, 2011.

PEDRO, S.R.M.; CAMARGO, J.M.F. In Biodiversidade do Estado de São Paulo Invertebrados Terrestres. **Apoidea Apiformes**, São Paulo, v.5, p.193-211, 1999.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M. P.; TOUFFET - BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, p. 71-83, 2005.

SAKAGAMI, S.F. Stingless bees. In: Herman, H.R. (ed.) **Social Insects**. New York: Academic Press, v.3, p. 362-423, 1982.

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

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Documentos 42. EMBRAPA: CNPMA, Jaguariúna, 2004. 29p.

MAPEAMENTO DE ABELHAS PARTICIPATIVO, 2016; Disponível em: <  
[http://projecolmeiaviva.org.br/wp-content/uploads/2016/10/Relatorio\\_previo\\_WEB-30set2016.pdf](http://projecolmeiaviva.org.br/wp-content/uploads/2016/10/Relatorio_previo_WEB-30set2016.pdf)>

DEL SARTO, M. C. L.; PERUQUETTI, R. C.; CAMPOS, L. A. O. Evaluation of the neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) as pollinator of greenhouse tomatoes. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 2, p. 260-266, 2005.

VIANA, Blandina Felipe, et al. STINGLESS BEES FURTHER IMPROVE APPLE POLLINATION AND PRODUCTION. **Journal of Pollination Ecology**, p.14, 2014.

ROSELINO, A. C., et al. Differences between the quality of strawberries (*Fragaria x ananassa*) pollinated by the stingless bees *Scaptotrigona* aff. *depilis* and *Nannotrigona testaceicornis*. **Genetics and Molecular Research**, v.8, n.2, p. 539-545, 2009.

MALAGODI-BRAGA, Kátia Sampaio; KLEINERT, Astrid de Matos Peixoto. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses? **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n.7, p. 771-773, 2004.

NUNES-SILVA, Patrícia, et al. Stingless bees, *Melipona fasciculata*, as efficient pollinators of eggplant (*Solanum melongena*) in greenhouses. **Apidologie**, v.44, n. 5, p.537-546, 2013.

SOUZA, T. F. Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), por meio de análises morfológicas e comportamentais. 2009. 49f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

CRUZ, D.D.O., FREITAS, B.M., SILVA, L.A.D., SILVA, E.M.S.D., BOMFIM, I.G.A. Pollination efficiency of the stingless bee *Melipona subnitida* on greenhouse sweet pepper. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n.12, p. 1197-1201, 2005.

dos SANTOS, S. A., ROSELINO, A. C., BEGO, L. R. Pollination of cucumber, *Cucumis sativus* L. (Cucurbitales: Cucurbitaceae), by the stingless bees *Scaptotrigona* aff. *depilis* Moure and *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier (Hymenoptera: Meliponini) in greenhouses. *Neotropical entomology*, v.37, n.5, p. 506-512, 2008.

## Capítulo 1

### Biological Data of Stingless Bees with Potential Application in Pesticide Risk Assessments

AS DORIGO<sup>1</sup>, AS ROSA-FONTANA<sup>1\*</sup>, IF CAMARGO<sup>2</sup>, RCF NOCELLI<sup>2</sup>, O  
MALASPINA<sup>1</sup>

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

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

**Abstract** - Due to the current practice of intensive pesticide use in Brazil on crops with flowers that are attractive to bees, biological information about Brazilian native bees is required in order for public authorities that are responsible for environmental safety to use them for calculations of risk assessments. Thus, the present study aimed to obtain biological data on stingless bees: *Melipona scutellaris*, *Scaptotrigona postica* and *Tetragonisca angustula*. The food consumed by larvae and by adults and the mass of forager workers were obtained. The results provide essential inputs for the risk assessment of stingless bee exposure to pesticides., combined with information about the concentrations of these substances in crops with flowers that are attractive to bees, may be used in risk calculations.

**Keywords:** model organism, pesticides, pollinators, risk assessment, sensitivity to pesticides, stingless bees' larval food.

Brazil has the greatest global richness of stingless bees (Michener 2013) and is also the world's largest consumer of pesticides (MAPA 2017). Therefore, it is essential that ecotoxicological information on native fauna be made available to agencies responsible for environmental assessments of pesticides, represented in the case of Brazil by the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA). According to IBAMA (2017), among the main limitations for pesticide risk assessments for native bees is the lack of basic data on the biology of these bees, such as food consumption at different life phases and the mass of the individuals. In addition, the safety of the current use of the exotic species, *Apis mellifera*, as a substitute for the other native species of Brazil in these assessments is questioned.

*Melipona scutellaris*, *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona postica* are interesting species to be used as model organisms for risk assessment because in addition to composing the native Brazilian fauna, they are recognized as effective pollinators of agricultural crops (Slaa et al. 2006) and because there is a need for biological data on stingless bee species, which may be useful for carrying out risk assessments for native species (IBAMA 2017). Based on the data gaps mentioned, the present study aimed to provide data to fill the gaps in knowledge about the biology of stingless bees.

To quantify the larval food consumed by brood cell, as well as the daily syrup consumption and the individual mass of worker foragers, three non-parental colonies of each species, maintained at Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brazil, were used. To measure the amount of larval food consumed per brood cell, the food of 20 cells per colony was collected by random selection. With an automatic micropipette, the food from each colony was homogenized in Eppendorf microtubes with volumetric graduation. They were weighed in an analytical balance before and after the food collection. The total volume and mass were divided by the number of brood cells to estimate the amount of individual food per cell.

To estimate the food consumption and individual mass of worker foragers, individuals from the three species (total number/species = 30 for each test) were collected at the entrances of the nests when they left to forage. The mass of the individuals was verified using an analytical balance. To check the food consumption, 10 individuals from the same colony were placed on plastic perforated pots for air circulation. Syrup feeders (sugar and water 1:1, v:v), simulating nectar, were placed on the pots, and the bees fed *ad libitum*. For 4 days, every 24 hours, the feeders were weighed using an analytical balance in order to verify daily consumption.

In addition to the establishment of the data for the stingless bee species, the same data for honey bees were taken from literature, in order to compare them to the first ones.

The mean values of the larval food consumed by brood cell, the daily syrup consumption by forager workers, the individual mass of the bees and the data taken from literature are shown in the Table 1.

Table 1. Amount of larval food consumption by cell, daily syrup consumption and individual weight of forager workers.  $\pm$  indicates standard deviations values. “-” indicates absence of data.

|                               | Volume of larval food by brood cell ( $\mu$ L) | Mass of larval food by brood cell (mg) | Daily syrup consumption by worker (mg) | Individual mass of forager worker (mg) |
|-------------------------------|--|--|--|--|
| <i>Melipona scutellaris</i>   | 130.58 $\pm$ 0.52                              | 158.04 $\pm$ 5.18                      | 35.06 $\pm$ 9.15                       | 76.65 $\pm$ 2.9                        |
| <i>Scaptotrigona postica</i>  | 25 $\pm$ 1.14                                  | 32.5 $\pm$ 0.8                         | 9.45 $\pm$ 2.41                        | 17.02 $\pm$ 0.35                       |
| <i>Tetragonisca angustula</i> | 5.6 $\pm$ 0.77                                 | 7.96 $\pm$ 1.03                        | 7.23 $\pm$ 1.74                        | 4.1 $\pm$ 0.37                         |
| <i>Apis mellifera</i>         | 160 <sup>†</sup>                               | -                                      | 50 <sup>†</sup>                        | 79.1 $\pm$ 4.9 <sup>†</sup>            |

<sup>†</sup> The data of volume of larval food by brood cell, daily syrup consumption by worker and individual weight of forager worker were obtained, respectively, from Aupinel (2005), Cresswell et al. (2012) and Blatt and Roces (2001).

These results provide essential inputs for the risk assessments of exposure of stingless bees to pesticides. The data on the amount of food consumed by larvae and syrup by forager workers, combined with information on the concentrations of these substances in agricultural crops with flowers that are attractive to bees, may be used for risk assessments. Understanding this relationship is extremely relevant since Brazil currently bases its protocols on standards of the OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), which uses *A.*

*mellifera* as a model organism. These protocols were adopted by the United States EPA (Environmental Protection Agency) for the schematization of risk assessment, which was used as a reference for the current Brazilian risk assessment scheme. Nevertheless, among the main uncertainties noted by IBAMA (2017), the use of *A.mellifera* stands out, since stingless bees are part of the native pollinator fauna. One way to remedy this issue would be to carry out a comparison of *A.mellifera* with native species regarding the toxicity of and exposure to pesticides, and our work provides important information that contributes to this evaluation. The differences between the groups are evident in biological parameters, such as their larval feeding systems. While *A.mellifera* nurse workers progressively deposit the food to the brood, in stingless bees, they do it all at once, depositing all the food that will be consumed (Velthuis 1998). In addition, the volume of food consumed by the brood also differs between groups: in *A.mellifera*, each larva consumes a total of 160  $\mu$ l (Aupinel 2005), and in the stingless bee species, *M.scutellaris*, *S.postica* and *T.angustula*, each larva ingests 130.58, 25 and 5.6  $\mu$ l, respectively. The nectar consumption by the forager workers and the individual mass of the bees also give rise to the uncertainty about using *A.mellifera* as a study model in Brazil. According to Cresswell et al. (2012), one forager worker of *A.mellifera* consumes a daily average of 50 mg of nectar and weighs on average of 79.1 mg, showing greater food consumption and body mass comparing to stingless bees (Table 1).

In addition to that, the mass of individuals presented herein may be a relevant factor in the sensitivity of the different species to a particular type of pesticide, for example. Comparing the sensitivity of bee species to exposure to pesticides, a meta-analysis study conducted by Arena and Sgolastra (2014) indicated the sensitivity of stingless bees was in general higher than bumblebees. In addition, Devillers et al. (2003) suggested the sensitivity of different bee species is generally inversely proportional to their mean body mass.

Nevertheless, it is interesting to observe that, in the workers of the species of smaller body size of this study, *T.angustula*, the amount of food consumed corresponds to twice the body mass, compared to the other species of stingless bees and also to *A.mellifera*. This is an interesting point to be considered for future investigations regarding species-sensitivity.

In this work, some information required for the characterization of pesticide exposure risks to stingless bees was presented. Although there is a high richness of stingless bee species in Brazil, little is known about their basic biological data (IBAMA 2017). For the inclusion of native species in risk assessments of pesticides in Brazil, it is necessary that this approach continues in future studies.

### **Acknowledgements**

We thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP process N° 2016/00328-4) and CAPES for financial support.

### **References**

- Arena, M., & Sgolastra, F. (2014). A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*, 23(3), 324-334.
- Aupinel, P., Fortini, D., Dufour, H., Tasei, J., Michaud, B., Odoux, J., & Pham-Delegue, M. (2005). Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. *Bulletin of Insectology*, 58(2), 107.
- Cresswell, J. E., Page, C. J., Uygun, M. B., Holmbergh, M., Li, Y., Wheeler, J. G., ... & Tyler, C. R. (2012). Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology*, 115(6), 365-371.

Devillers, J., Decourtye, A., Budzinski, H., Pham-Delegue, M. H., Cluzeau, S., & Maurin, G. (2003). Comparative toxicity and hazards of pesticides to Apis and non-Apis bees. A chemometrical study. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 14(5-6), 389-403.

IBAMA. (2017). Avaliação de risco de agrotóxicos para insetos polinizadores e lacunas de conhecimento.

[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/noticias2017/nota\\_tecnica\\_avaliacao\\_de\\_risco\\_de\\_agrotoxicos.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/noticias2017/nota_tecnica_avaliacao_de_risco_de_agrotoxicos.pdf). (accessed date: 30 June, 2017)

MAPA. (2017). Agrotóxicos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Accessed 10 July 2017.

Michener, C.D. (2013). Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees.

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

Velthuis, B. J., & Velthuis, H. H. W. (1998). Columbus surpassed: biophysical aspects of how stingless bees place an egg upright on their liquid food. *Naturwissenschaften*, 85(7), 330-333.

## Capítulo 2

### **Protocolo de criação larval *in vitro* de *Melipona scutellaris* para estudos toxicológicos**

AS DORIGO, AS ROSA-FONTANA, HMS LIMA, TC GRELLA, JSG TEIXEIRA,  
RCF NOCELLI, O MALASPINA

#### **1. INTRODUÇÃO**

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), 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 as 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).

A família Apidae, que contém as abelhas corbiculadas, possui três subfamílias, dentre elas Apinae composta por 19 tribos, incluindo Meliponini (popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão, meliponíneos, abelhas nativas ou abelhas indígenas). Este grupo compartilha com a tribo Apini (que inclui a espécie *Apis mellifera*) hábitos altamente sociais (eussociais), contendo uma rainha incumbida pela reprodução e operárias encarregadas por todas as outras tarefas do ninho, como defesa, limpeza, alimentação da cria, construção de favos ou potes de mel, construção de favos ou discos de cria, e o forrageamento. O forrageamento é uma das funções mais importantes para a colônia, pois consiste na busca por pólen, néctar e outros materiais necessários para a sobrevivência do ninho. É comum a presença de corbícula

nas fêmeas, que é uma concavidade onde é possível transportar o pólen e outras substâncias para o ninho (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; MICHENER, 2000; SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010).

As abelhas da tribo Meliponini, que compreendem o gênero *Melipona* e todos os demais gêneros (MICHENER, 2000) de abelhas sem ferrão, são assim chamadas por apresentarem seu acúleo (ferrão) atrofiado, o que impede que as mesmas ferroem (NOGUEIRA-NETO, 1997). Atualmente existem 32 gêneros com 409 espécies descritas de abelhas sem ferrão sociais (excluindo-se os grupos extintos) (CAMARGO E PEDRO, 2013), dentre as quais pode-se citar a espécie *Melipona scutellaris*, conhecida como uruçú ou uruçú nordestina. Tal espécie, foco de estudo do trabalho, é endêmica do nordeste do país, mas tem se adaptado bem ao sudeste, onde foi introduzida por meliponicultores (VIANA, 2010).

Essa espécie apresenta um elevado potencial como agente polinizador e produtor de mel, além de apresentar fácil manejo, pois não ferroa (NOGUEIRA-NETO, 1997), sendo ainda considerada uma espécie potencial para ser utilizada como polinizador em ambiente protegido ou campo aberto (IMPERATRIZFONSECA; SARAIVA; DE JONG, 2006). Além dessas justificativas para o uso desta espécie como modelo de estudo, *M. scutellaris* 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 liberação do pólen. Este sistema é essencial para plantas com anteras poricidas, onde o pólen apenas é liberado por poros apicais (HEARD, 1999; NUNES-SILVA; IMPERATRIZ-FONSECA, 2010).

A elevada riqueza e diversidade de espécies de abelhas sem ferrão faz-se importante para a manutenção da biodiversidade, pois são responsáveis por aproximadamente 40 – 90% da polinização de árvores nativas dependendo do ecossistema considerado e, conseqüentemente, pela produção de frutos e sementes. Em relação ao Brasil, de 141 culturas,

85 dependem dos polinizadores, e os serviços de polinização geram um mercado de aproximadamente US\$45 bilhões anuais (GIANNINI et al., 2015). Os meliponíneos chegam a polinizar, em áreas agrícolas, cerca de 66% das 1.500 espécies cultivadas no mundo, resultando em uma estimativa de 15 a 30% da produção mundial de alimentos (KLEIN et al., 2002).

Porém, tal serviço ecossistêmico prestado de forma gratuita por esses polinizadores tem diminuído, o que gera, conseqüentemente, impactos negativos como a perda de valor econômico das culturas, o que pode levar a um impacto social significativo, com a falta de alimento e também ao decréscimo e extinção de várias espécies vegetais (BRITAIN E POTTS, 2011; KLATT et al., 2013).

As abelhas estão suscetíveis à ação de agrotóxicos durante a pulverização no período de florada, quando realizam o forrageamento, ou pela ingestão de pólen e néctar contaminados com esses compostos (RORTAIS et al., 2005). Em função do hábito eussocial destas abelhas, além das forrageiras estarem em contato direto com inseticidas no campo, quando retornam à colmeia, podem levar recursos florais potencialmente contaminados com resíduos que serão posteriormente processados pelas operárias nutridoras e oferecidos às crias (VILLA et al., 2000; RORTAIS et al., 2005, HARTFELDER et al., 2006). Sendo assim, é importante enfatizar que os diferentes estágios de desenvolvimento desses polinizadores são relevantes para avaliação, o que inclui a exposição durante a fase larval, através da ingestão de resíduos (ROSA et al., 2016).

O sistema digestório é o primeiro a entrar em contato com os agrotóxicos quando ingeridos. Uma vez que esses inseticidas chegam na hemolinfa do inseto adulto, uma parcela do inseticida ingerido alcança o cérebro, órgão alvo da molécula, o qual é protegido pela barreira hematopoiética. O cérebro é o centro de associação dos insetos, ele recebe estímulos de órgãos sensoriais da cabeça e de partes posteriores do corpo por meio de interneurônios que compõe a cadeia nervosa ventral. Nas abelhas é composto por regiões que contém corpos

celulares, que são chamadas de somata ou prolongamentos celulares, chamadas de neurópilas (CHAPMAN, 1998).

Ele é formado pela fusão de três gânglios, o tritocérebro, deutocérebro e protocérebro. É neste último que se encontram os lobos ópticos, uma estrutura que se apresenta em camadas devido à disposição das células e seus prolongamentos. Essa região é composta pela retina e por células fotorreceptoras e responsável pelo processamento visual, os lobos ópticos direito e esquerdo estão interligados pela ponte cerebral, formada por uma massa de neurópilas (RIBI et al., 2008). O proteocérebro também contém os corpos pedunculados (Figura 1), os centros mais importantes de processamento, aprendizagem e memória, distribuídos em dois pares com grande volume e grande quantidade de células e sinapses (CRUZ-LANDIN, 2009). Cada corpo pedunculado é constituído por uma neurópila em forma de cálice e preenchido por corpos celulares, chamados células de Kenyon (FARRIS, 2005; FAHRBACH, 2006; SOUZA, 2009). O cálice é dividido em anéis de neurópila que ficam em torno dos corpos celulares, sendo eles os lábios, que formam a borda do cálice, o colar e o anel basal, que é o fundo do cálice de onde partem os pedúnculos (Figura 1).

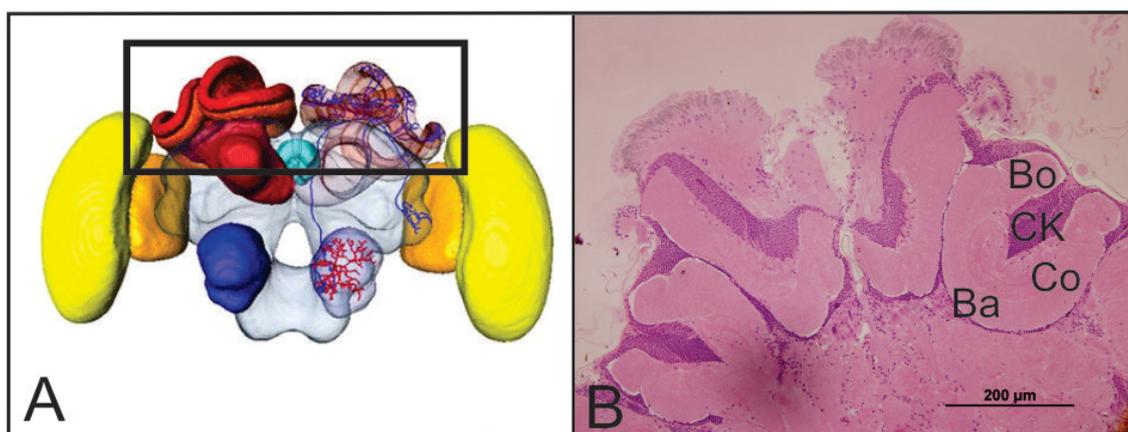


Figura 1: Esquema (A) e foto (B) do cérebro de abelha *M. scutellaris*, corado em Hematoxilina e Eosina (HE). (Bo – Borda; CK – Células de Kenyon; Co – Colar; Ba – Base). Esquema (A) adaptado de neurobiologie.

Além das alterações histológicas, a sensibilidade dos organismos a distúrbios ambientais durante o desenvolvimento pode ter como consequência uma tendência a mudanças

morfológicas em resposta a essas perturbações, o que é conhecido como instabilidade no desenvolvimento. Essa instabilidade é expressa fenotipicamente através da variação dentro do indivíduo e pode ser mensurada através da assimetria flutuante em organismos bilaterais, parâmetro considerado indicador de alterações ambientais (DONGEN, 2006). Considerando que o fenótipo é onde o resultado da perturbação será observado, a presença de alterações em relevantes marcadores morfológicos como distância intertegular e largura da cabeça (BOSCH; VICENS, 2002; LIMA et al., 2011; LIMA et al., 2013; ROSA et al., 2016) e/ou tamanho e forma das asas indicaria que o organismo está sob pressão de algum tipo de estressor ambiental (COSTA, 2008).

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). Além disso, a maioria dos trabalhos existentes abordam indivíduos adultos (CRESSWELL et al., 2012; TOMÉ et al., 2012; GOULSON, 2013; COSTA et al., 2014; THOMPSON et al., 2014; DIVELY et al., 2015; KESSLER et al., 2015; JACOB et al., 2015; SOARES et al., 2015).

O método para criação larval de *A. mellifera* já está padronizado pela Organização para Cooperação e o Desenvolvimento Econômico, (OECD, 2013), baseados nos trabalhos de Aupinel et al. (2005) e Aupinel et al. (2007). Esses protocolos foram adotados pela agência ambiental dos Estados Unidos para a esquematização de avaliação de risco, que foi adotada como referência para o atual esquema 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. Uma forma de sanar essa

dúvida seria a realização de uma comparação de *A. mellifera* com as espécies sem ferrão, no que se refere à toxicidade e exposição aos agrotóxicos.

O desenvolvimento de métodos para estudos com larvas possibilitou uma melhor avaliação e representação do que acontece na colônia com as larvas que são contaminadas com inseticidas trazidos pelas operárias. Entretanto, enfatiza-se a necessidade do desenvolvimento e padronização de métodos de criação *in vitro* para abelhas sem ferrão, uma vez que os sistemas de alimentação larval diferem entre os grupos: enquanto em *A. mellifera* as operárias nutrizas depositam o alimento às crias de forma progressiva (HAYDAC, 1970), em abelhas sem ferrão elas o fazem de uma única vez, depositando todo o alimento que será consumido (ROUBIK, 1982; HARTFELDER, 2006).

O primeiro método de criação de abelhas sem-ferrão foi descrito por Camargo et al. (1972), mas este apresentava algumas deficiências que inviabilizavam a obtenção de indivíduos recém-emergidos em número suficiente para a realização de testes de toxicidade. Atualmente, estudos realizados por Menezes et al. (2013), apresentaram adaptações ao método descrito por Camargo et al. (1972) e aplicaram à criação *in vitro* de rainhas de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. Os resultados mostraram boa taxa de emergência, adequações na umidade relativa do ar e na quantidade de alimento durante o experimento, e também ocorreu que as abelhas emergidas *in vitro* foram caracterizadas como semelhantes às abelhas emergidas naturalmente (*in vivo*), o que abriu novas possibilidades para os testes com meliponíneos. Porém, não existe padronização para operárias até o momento.

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. A padronização de um método de criação para meliponíneos pode simular os

efeitos reais destes compostos químicos em abelhas sem ferrão, contribuindo na construção de ações regulatórias que auxiliem na conservação de polinizadores.

## **2. OBJETIVOS:**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de criação *in vitro* de larvas de *M. scutellaris*, a fim de propor sua aplicabilidade em testes de toxicidade de agrotóxicos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**2.2.1.** Avaliar as taxas de mortalidade de larvas, e as taxas de emergência relativa a larvas e a pupas dos indivíduos.

**2.2.2.** Avaliar o tempo de duração dos indivíduos até o período de pupação, defecação e mudança de coloração de olhos das pupas, a fim de verificar o tempo de desenvolvimento do primeiro instar larval até a emergência de adultos.

**2.2.3.** Avaliar a morfologia de indivíduos recém emergidos provenientes da criação *in vitro* e de favos naturais (*in vivo*) para checar a representatividade dos primeiros em relação ao segundo.

**2.2.4.** Determinar a concentração letal média (Cl<sub>50</sub>) do inseticida padrão Dimetoato para validação do método proposto.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Procedimentos precedentes aos bioensaios *in vitro*

Antes de dar início aos experimentos, a altura e o diâmetro das células de favos naturais foram mensurados com auxílio de paquímetro digital, a fim de se reproduzir as dimensões das células em placas de acrílico para os experimentos, como mostra a figura 2.

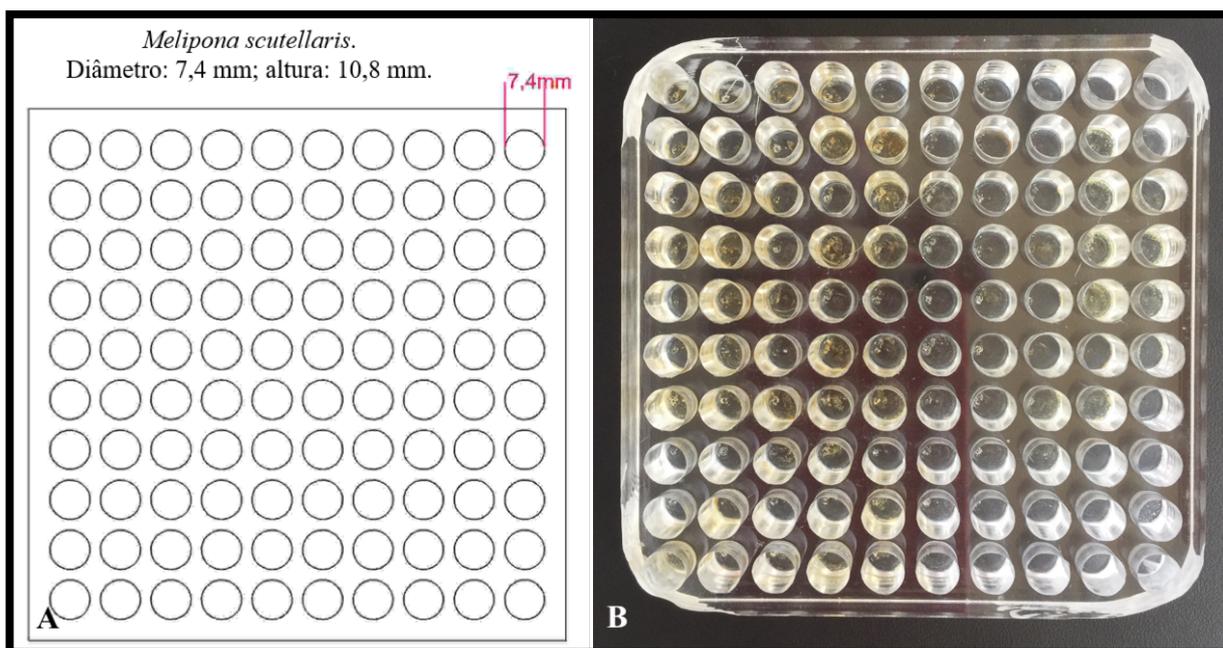


Figura 2: Placa de acrílico utilizada para bioensaios larvais.

#### 3.2. Descrição do protocolo proposto

Os favos contendo larvas de *M. scutellaris* foram coletados no meliponário do Departamento de Biologia da “Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, no qual foram selecionadas três colônias não parentais, em condições ideais para a coleta, sendo as mesmas saudáveis, com grande número de indivíduos e com rainha jovens e fortes que podem ser identificadas pela coloração de seu abdômen e pelo desgaste de suas asas, pois rainhas com abdômen escuro e asas mais curtas e desgastadas são consideradas rainhas velhas e sua postura pode ser menor. A coleta dos favos foi realizada de modo que não prejudicasse a sanidade das colônias, abrindo-se as caixas com cuidado para não

danificar os potes de mel e pólen (Figura 3A).

A técnica adotada para os bioensaios *in vitro* foi baseada no método desenvolvido por Menezes et al. (2013) para criação de rainhas de *Scaptotrigona* aff. *depilis*, adaptando-se a técnica para o desenvolvimento de operárias de *M. scutellaris*.

Para mensurar a quantidade de alimento larval por célula de cria, o alimento de 20 células por colônia escolhidas aleatoriamente foi coletado. Os favos coletados já estavam operculados e continham ovos recém ovipositados. Com auxílio de micropipeta automática, o alimento proveniente de cada colônia foi homogeneizado em microtubos tipo eppendorf com graduação volumétrica. Os mesmos foram pesados em balança analítica antes e depois da coleta do alimento. O volume e peso total foram divididos pelo número de células de cria, estimando-se a quantidade de alimento individual por célula.

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 (Figura 3B).

Antes da transferência do alimento e das larvas, foram preparadas as placas de acrílico 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  $95\pm 5\%$  dentro da placa nos primeiros 5 dias de incubação.

Sendo assim, favos de cria foram coletados das colônias mantidas nas caixas racionais e levados ao laboratório. Foram coletados dois tipos de favos de cria, um contendo ovos para a retirada de alimentos e outro contendo larvas de primeiro instar. As células contendo ovos foram desoperculadas, os mesmos foram removidos, e o alimento larval foi coletado com o auxílio de micropipeta automática, sendo retirados 13 mL de alimento de cada colônia,

totalizando 36 mL.

Em seguida, todo o alimento coletado foi misturado e homogeneizado para ser distribuído pelas placas com auxílio de uma micropipeta de repetição, sendo depositados 130 $\mu$ L de alimento larval dentro de cada cavidade da placa de acrílico (Figuras 3C e 3D) e logo após as larvas foram transferidas com auxílio de uma agulha apícola. Durante a transferência de larvas não é possível distinguir os favos em que irão emergir operárias, rainhas ou machos. Após realizada a transferência (Figuras 4A, 4B e 4C) as placas de Petri foram preenchidas com água destilada e mantidas em estufa incubadora B.O.D (Biochemical oxygen demand) a 30°C e umidade relativa do ar a 95% (Figuras 4D, 4E e 4F). As condições de temperatura e umidade da B.O.D foram mantidas até o final dos experimentos.

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% e para isso foi adicionado à placa de Petri uma solução de cloreto de sódio (NaCl). A redução da umidade se deu devido a ambientação dos bioensaios serem o mais próximo possível do que ocorre na colônia e como explicado em Menezes et al. 2015, com o passar dos dias há uma redução gradual na quantidade de cera depositada na operculação dos favos e isso faz com que a umidade interna da célula seja reduzida.

Os experimentos foram repetidos quatro vezes, em intervalos que não prejudicassem o desenvolvimento das colônias, sendo que cada um deles foram utilizadas 3 placas, totalizando a transferência de 1.200 larvas.

A fim de avaliar a viabilidade da utilização de ovos na criação *in vitro*, foram adicionadas nos dois primeiros experimentos uma 4ª placa, também com 3 repetições e cada uma contendo 20 ovos transferidos, totalizando 120 ovos. Em geral cada execução do experimento durou em média 45 dias com intervalos de 1 mês entre eles, a fim de não prejudicar as colônias.



Figura 3: Representação das fases experimentais da criação *in vitro* de abelhas da espécie *Melipona scutellaris*. (A) Coleta de favos na caixa racional. (B) Preparação do ambiente para transferência. (C) e (D) Distribuição de alimento nas placas de acrílico.

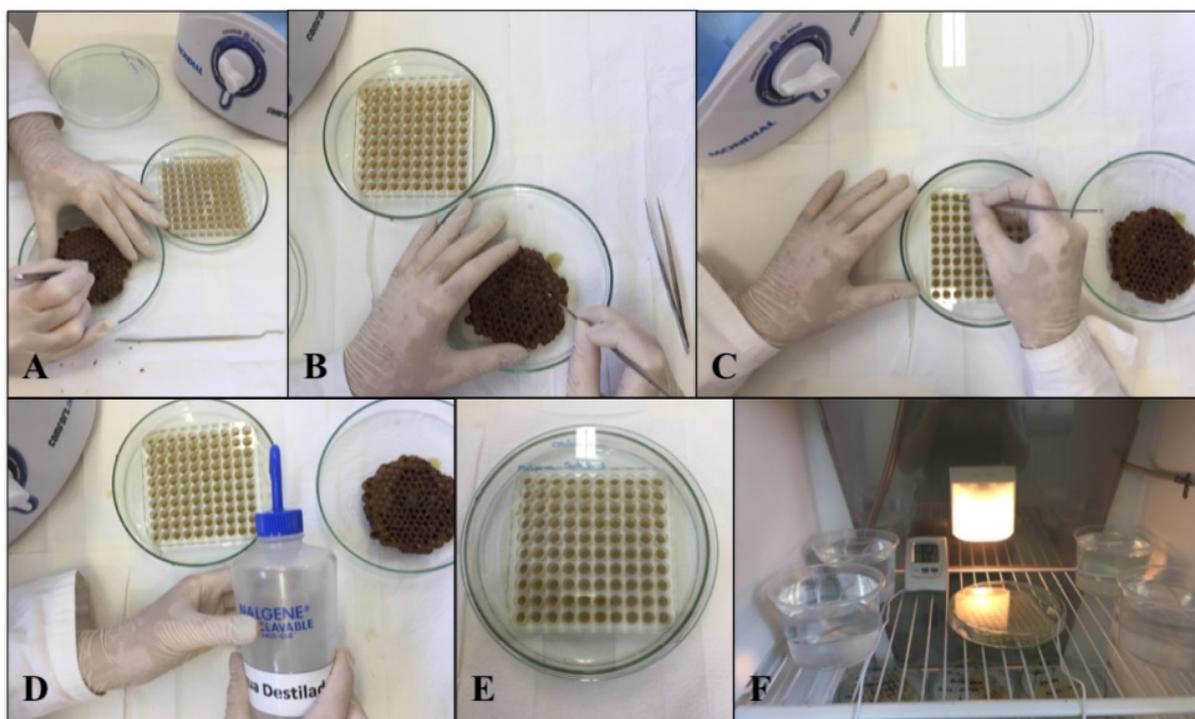


Figura 4: Representação das fases experimentais da criação *in vitro* de abelhas da espécie *Melipona scutellaris*. (A) Desoperculação do favo. (B) e (C) Transferência das larvas. (D) Acréscimo de água destilada à placa de Petri. (E) Larvas transferidas. (F) Experimento em andamento.

### **3.3. Verificação dos parâmetros estabelecidos**

Para verificar a funcionalidade deste método, vários parâmetros foram observados e registrados após a transferência e alimentação das larvas, os quais são indicativos da progressão das fases do desenvolvimento larval como: defecação, taxa de pupação, taxa de emergência de adultos e mortalidade de larvas.

No dia seguinte à transferência, com o auxílio de um estereomicroscópio, as larvas que não sobreviveram ao manuseio foram removidas, anotando-se o número amostral de cada colônia. A taxa de mortalidade começou a ser contabilizada a partir do segundo dia de transferência, uma vez que a mortalidade durante as primeiras 24 horas foi atribuída ao manuseio das larvas durante a transferência e não ao experimento em si. Os outros parâmetros foram sendo avaliados de acordo com o progresso do teste.

### **3.4. Análises morfométricas**

#### **3.4.1. Distância intertegular e largura da cabeça**

Foram analisadas a distância intertegular e largura da cabeça tanto para abelhas emergidas *in vitro* como para abelhas emergidas *in vivo*, para que houvesse uma comparação que pudesse provar a semelhança entre elas e a fim de verificar possíveis deformidades provenientes da criação *in vitro* (Figura 5A e 5B). Para tanto, foram utilizadas 10 abelhas por colônia, totalizando 30 indivíduos por experimento. Machos e rainhas emergidos foram excluídos destas análises, utilizando-se então, apenas operárias. As medidas foram feitas através de imagens obtidas por um estereoscópio com câmera acoplada (Leica M 205 C) e pelo software LAS V4.8 utilizando o módulo de medidas do próprio software.

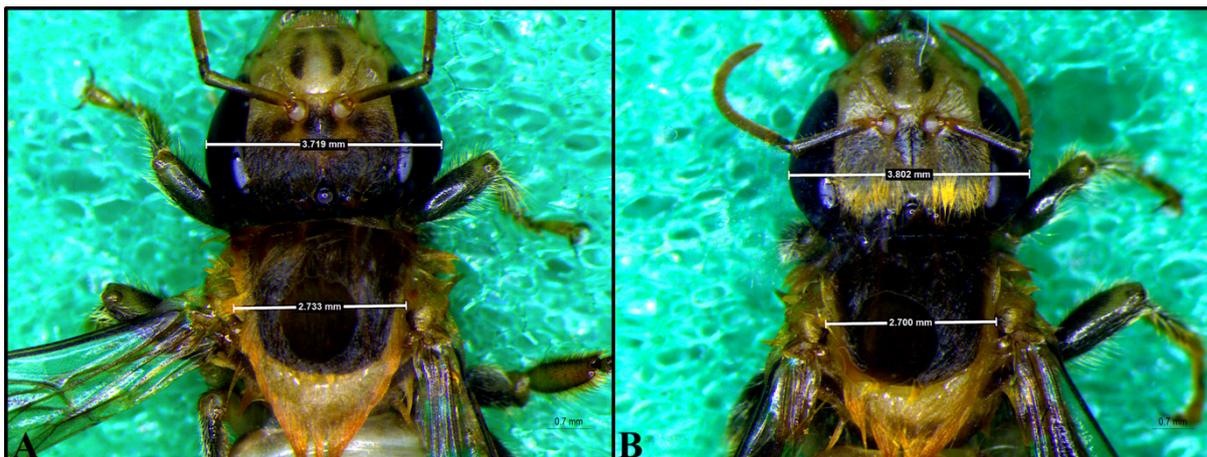


Figura 5: Largura da cabeça e distância intertegular de operárias de *M. scutellaris* criadas *in vitro* e *in vivo*. (A) abelha emergida *in vitro*. (B) abelha emergida *in vivo*. Valores dentro dos retângulos indicam as médias das medidas morfométricas.

### 3.4.2. Simetria de Asas

Com o mesmo propósito do item anterior, foram analisadas possíveis assimetrias nas asas anteriores de abelhas emergidas *in vitro* e *in vivo*. Para cada procedimento, foram utilizadas 10 abelhas por colônia, totalizando 30 indivíduos por experimento. Machos e rainhas emergidos foram excluídos destas análises, utilizando-se então, apenas operárias. Asas anteriores dos indivíduos foram removidas, montadas em lâminas e fotografadas com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio. A partir delas foi construído um arquivo .tps com o auxílio do software tpsUtil versão 1.40 (Rohlf, 2008). Onze marcos anatômicos das junções das nervuras das asas foram estabelecidos (Figura 6), com o software tpsDig versão 2.12 (Rohlf, 2008), e foram avaliados parâmetros como tamanho do centroide (raiz quadrada da soma das distâncias quadradas dos marcos anatômicos ao centroide, ou centro de massa) e forma das asas (KLINGENBERG et al., 1998).

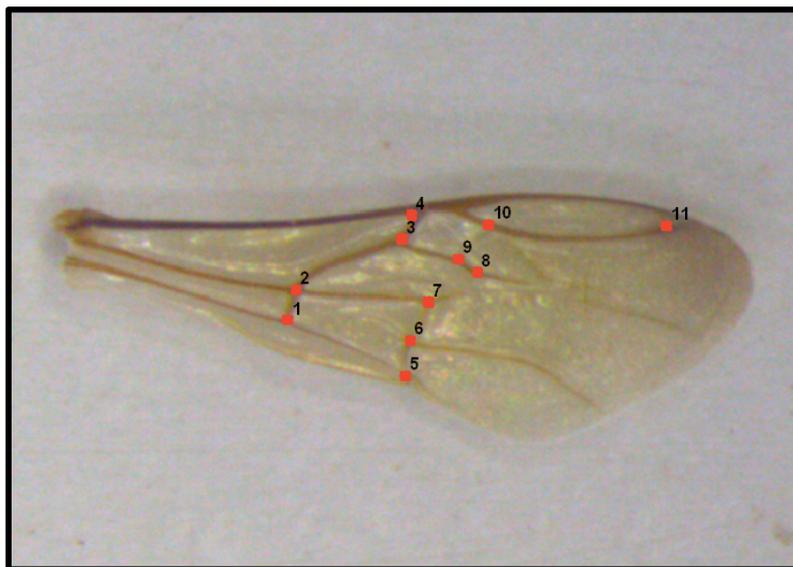


Figura 6: Marcos anatômicos das junções das nervuras das asas de operárias de *M. Scutellaris* com 24h de emergidas.

### 3.5. Análises histológicas

Foram analisados cortes histológicos dos cérebros das abelhas emergidas *in vitro* e abelhas emergidas *in vivo*, para que houvesse uma terceira comparação para a afirmação da semelhança entre elas e a fim de verificar possíveis alterações provenientes da criação *in vitro*.

Foram dissecadas abelhas recém emergidas *in vivo* e *in vitro*, sendo 5 abelhas por colônia, totalizando 15 abelhas. Os cérebros retirados, foram fixados em paraformaldeído tamponado a 4% por 24 horas e estabilizados em Tampão Fosfato de Sódio (PBS), pH 7,4 e 0,1 M também por 24 horas. Em seguida seguiu-se o protocolo padrão para inclusão em historesina Leica para análises morfológicas. Foram realizadas secções de 5 $\mu$ m de espessura obtidas a partir de um micrótomo (Leica), tais secções foram colocadas em lâminas histológicas, as quais passaram pela dupla coloração com Hematoxilina e Eosina, na mesma lâmina.

A coloração de Hematoxilina e Eosina foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por JUNQUEIRA; JUNQUEIRA (1983). Sendo assim, as lâminas foram mergulhadas em água destilada por 1 minuto, coradas com hematoxilina aquosa por 10 minutos, lavadas em água destilada por 5 minutos, e com água corrente por 1 minutos. Após estes

procedimentos, foram coradas com eosina por 5 minutos e novamente lavadas com água corrente por 1 minutos. Posteriormente, foram secas e montadas em DPX, meio de montagem permanente. Após a secagem das lâminas, os cortes foram analisados e fotografados em fotomicroscópio de luz Olympus utilizando-se o programa DP Controller para aquisição das imagens.

### **3.6. Determinação $CL_{50}$ do inseticida dimetoato**

Os procedimentos para a determinação da  $CL_{50}$  via oral basearam-se no protocolo da OECD - Organization for Economic Cooperation and Development (2014). Inicialmente o inseticida dimetoato (Dimetoathe Pestanal da empresa Sigma-Aldrich, Brasil), foi diluído em água e depois adicionado ao alimento larval, sendo as larvas transferidas em seguida. Porém, após 24 horas, observou-se que o conteúdo do alimento larval havia sido separado da parte líquida, ficando apenas na parte inferior da célula. Dessa forma, as larvas tinham acesso somente à parte aquosa, o que causou 100% de mortalidade nas larvas transferidas, pois as mesmas se alimentavam somente da água contaminada que ficou por cima do alimento que solidificou no fundo da placa.

Nos bioensaios seguintes, o inseticida foi diluído diretamente no alimento larval e, posteriormente, sucessivas diluições foram realizadas no alimento para atingir as concentrações a serem oferecidas às larvas (272 ng ingrediente ativo/ $\mu$ L alimento, 136 ng i.a./ $\mu$ L alimento, 68 ng i.a./ $\mu$ L alimento, 34 ng i.a./ $\mu$ L alimento, 17 ng i.a./ $\mu$ L alimento, 8,5 ng i.a./ $\mu$ L alimento, 4,25 ng i.a./ $\mu$ L alimento, 2,125 ng i.a./ $\mu$ L alimento) (Figura 7). A mortalidade dos indivíduos foi registrada 24 horas após o término da alimentação (168h após a transferência das larvas) e submetida à análise probit do software R<sup>®</sup>.

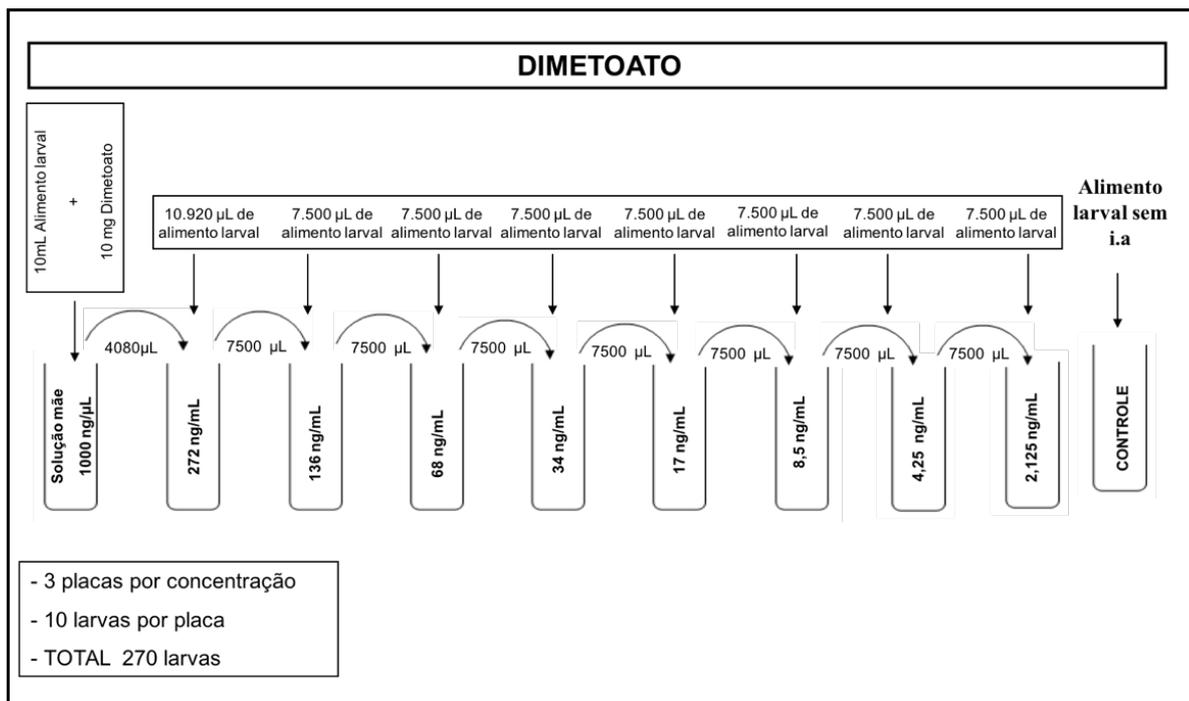


Figura 7: Cascata de Diluição utilizada para a determinação da  $CL_{50}$  do dimetoato.

### 3.7. Análises estatísticas

Os dados referentes a emergência das abelhas relativa ao número de larvas transferidas, a emergência das abelhas relativa ao número de pupas e a mortalidade das larvas no 5º dia de experimento (pós consumo de todo alimento oferecido) foram submetidos à análise estatística utilizando o software R<sup>@</sup> (R Core Team 2016).

Para cada um dos três parâmetros citados acima, foram realizados testes de associação entre os diferentes bioensaios de padronização. A probabilidade de associação (p-valor) foi obtida pelo qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher, de acordo com a composição dos dados analisados (tamanho da amostra e frequência esperada), sendo que  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Como as comparações múltiplas foram realizadas, os valores de p foram ajustados pelo método da taxa de descoberta falsa (FDR) de Benjamini-Hochberg.

Em relação à morfometria das asas, uma ANOVA padrão para assimetria flutuante foi utilizada para a análise do tamanho do centroide (PALMER AND STROBECK 1986), e uma ANOVA Procrustes correspondente foi utilizada para analisar a forma das asas

(KLINGENBERG et al., 1998). Em cada análise foram avaliados os parâmetros “individual” (indica comparação entre os indivíduos sem distinguir os lados) e “lado” (representa o lado direito e esquerdo do mesmo indivíduo). Essas análises foram conduzidas no software R versão 3.4.3.

Foi utilizado o teste t para amostras independentes (com significância ao nível de 0,05) para comparar as médias da distância intertegular e da largura da cabeça obtidas nos experimentos *in vitro* e dos favos *in vivo*. Todas as análises foram realizadas no software *GraphPad Prism 7*.

Para análise e determinação da  $CL_{50}$ , os dados de mortalidade foram observados a cada 24 horas e foram submetidos a análises estatísticas utilizando o software R<sup>@</sup> (R Core Team 2016). Para cada tempo observado (de 24 a 168 horas), foram realizados testes de associação entre as concentrações de dimetoato testadas. A probabilidade de associação e ajustes foram realizados da mesma forma como para as taxas de emergência e mortalidade relativas, descritas acima.

Os valores da concentração letal média ( $CL_{50}$ ) para o dimetoato foram determinados com os dados de mortalidade observados em 144 e 168 horas, que correspondem a 24 e 48 horas, respectivamente, após o consumo total de alimento contaminado com o inseticida pelas larvas. Os valores de  $CL_{50}$ , bem como, o intervalo de confiança à 95% e os valores de qui-quadrado foram estabelecidos a partir do trabalho de Pacheco e Rebelo (2013).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Desenvolvimento

As execuções dos testes do único tratamento realizado com *M. scutellaris* indicaram uma média de 80,2 % de emergência de indivíduos relativa a larvas, 92,61% relativa a pupas e uma média de 7,42% de mortalidade de larvas (tabela 1). As análises comparativas através do qui-quadrado entre todos os experimentos executados, demonstraram que todos são semelhantes estatisticamente (tabela 2). A tabela 3 apresenta os eventos que ocorrem durante o desenvolvimento de acordo com o protocolo proposto. Cada fase é representada nas figuras 8 e 9. Em relação às duas tentativas de transferências de ovos, a taxa de sobrevivência foi próxima de zero.

Tabela 1. Parâmetros que validam o protocolo de desenvolvimento de criação de proposto para *Melipona scutellaris*.

| Experimento | Taxa de emergência/ larvas (%)* | Taxa de emergência/ pupas (%)* | Mortalidade de larvas (%)* |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 1           | 77,87 ± 8,18                    | 89,14 ± 3,19                   | 8,64 ± 6,02                |
| 2           | 76,38 ± 6,13                    | 94,05 ± 8,4                    | 10,17 ± 5,56               |
| 3           | 78,88 ± 7,22                    | 93,54 ± 3,48                   | 6,71 ± 4,82                |
| 4           | 87,83 ± 9,64                    | 93,72 ± 6,93                   | 4,16 ± 1,02                |
| Média       | <b>80,2%</b>                    | <b>92,61</b>                   | <b>7,42%</b>               |

\*As primeiras taxas foram calculadas através da comparação da taxa de emergência em relação ao número de larvas vivas; no segundo em relação ao número de pupas vivas e o terceiro foram calculadas as mortalidades gerais no período de larva,

Tabela 2. Valores da probabilidade de associação (p-valor) entre os experimentos *in vitro* realizados com *Melipona scutellaris*. Os valores foram obtidos pelo qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher, de acordo com a composição dos dados analisados (tamanho da amostra e frequência esperada), sendo que  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

| Comparações | Taxa de emergência/<br>larvas | Taxa de emergência/<br>pupas | Mortalidade de larvas |
|-------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| T1 x T2     | 0,783                         | 0,48                         | 0,789                 |
| T1 x T3     | 0,783                         | 0,48                         | 0,581                 |
| T1 x T4     | 0,147                         | 0,67                         | 0,417                 |
| T2 x T3     | 0,672                         | 1                            | 0,5                   |
| T2 x T4     | 0,139                         | 1                            | 0,401                 |
| T3 x T4     | 0,192                         | 1                            | 0,581                 |

Tabela 3. Eventos que ocorrem durante o desenvolvimento de acordo com o protocolo proposto para *Melipona scutellaris*.

\* Os números ordinais indicam os dias exatos em que ocorreram os eventos.

± indica os valores de desvios padrão das médias.

| Teste | Duração da<br>alimentação<br>(dias) | Defecação* | Pupa olho<br>branco* | Pupa olho<br>rosa* | Pupa olho<br>marrom* | Pupa olho<br>preto* | Duração<br>até a<br>emergência<br>(dias) |
|-------|-------------------------------------|------------|----------------------|--------------------|----------------------|---------------------|--|
| T1    | 5                                   | 7°         | 15°                  | 18°                | 20°                  | 24°                 | 40                                       |
| T2    | 4                                   | 7°         | 16°                  | 18°                | 20°                  | 25°                 | 38                                       |
| T3    | 5                                   | 9°         | 16°                  | 22°                | 24°                  | 27°                 | 45                                       |
| T4    | 5                                   | 5°         | 17°                  | 19°                | 21°                  | 23°                 | 43                                       |
| Média | 4,8 ± 0,45                          | 7±1,41     | 15,8±0,84            | 18±1,74<br>dia     | 21,2±1,65            | 24,6±1,5            | 41,4±2,7                                 |

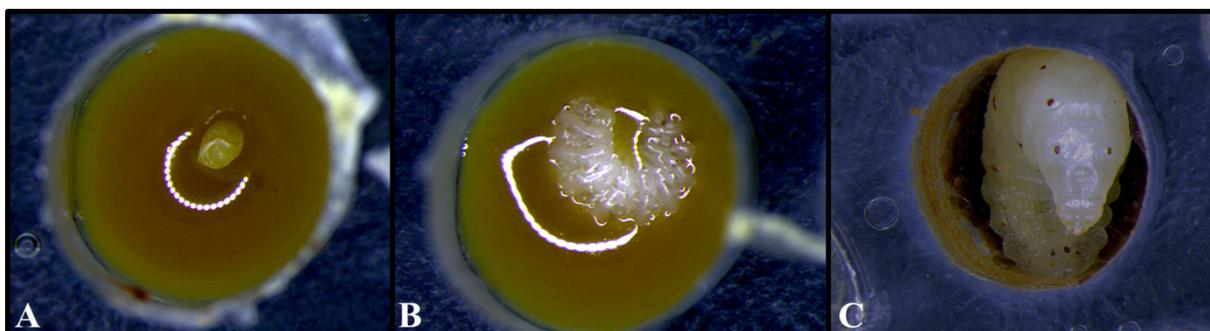


Figura 8: Fases larvais do desenvolvimento de operárias de *Melipona scutellaris*. (A) Ovo; (B) Larva com 24h após a eclosão;

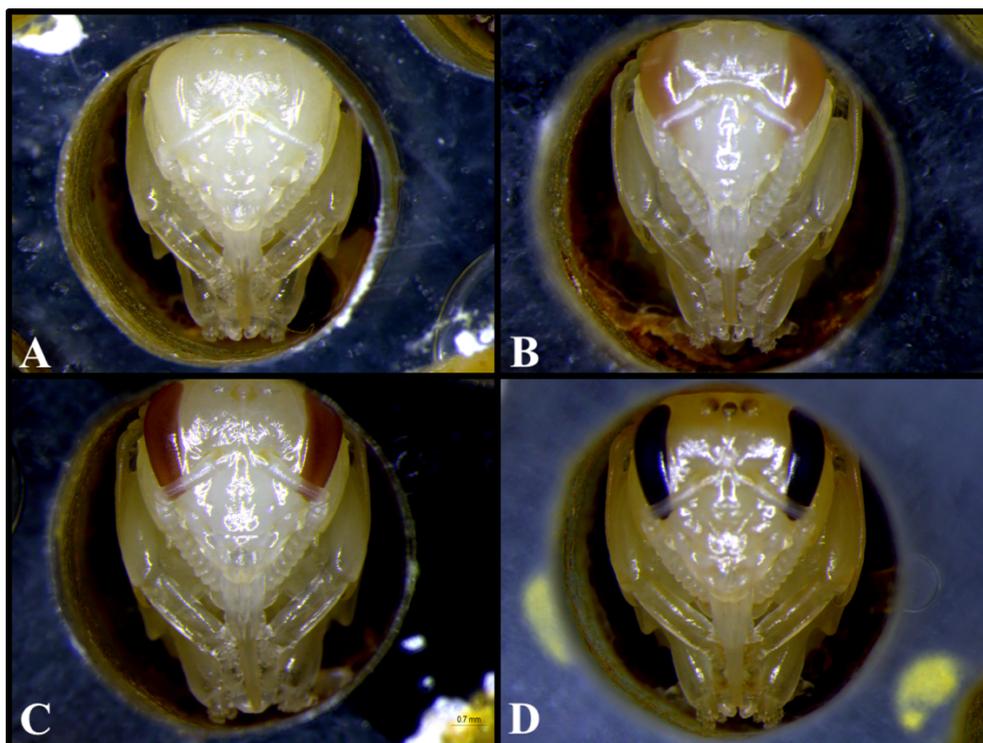


Figura 9: Fases de pupas do desenvolvimento de operárias de *Melipona scutellaris*. (A) Pupa de olho branco; (B) Pupa de olho rosa; (C) Pupa de olho marrom; (D) Pupa de olho preto.

## 4.2. Morfologia

### 4.2.1. Distância Intertegular e largura da Cabeça

A média da distância intertegular para o método *in vitro*, foi 2.58mm e para o método *in vivo* 2.67mm. Já para a largura da cabeça, *in vitro* foi 3.68mm e *in vivo* 3.70mm. O teste t indicou não haver diferença significativa entre os métodos *in vivo* e *in vitro*, sendo o valor de  $p > 0,05$  (Figura 10).

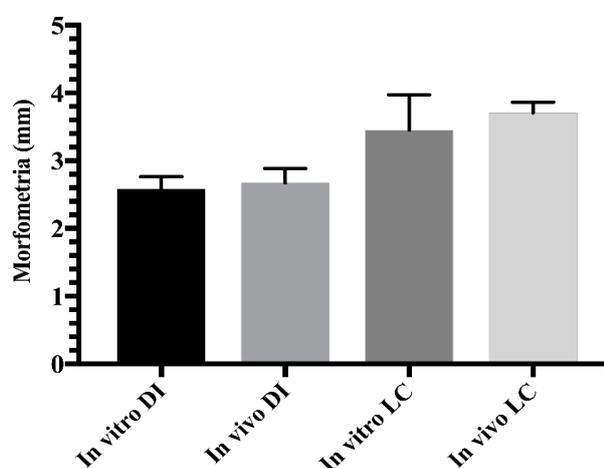


Figura 10: Medidas morfométricas (média em milímetros) de operárias de *Melipona scutellaris* criadas *in vitro* e *in vivo*. (DI – Distância intertegular; LC – Largura da cabeça).

#### 4.2.2. Assimetria de asas

Em relação à morfometria de asas dos indivíduos emergidos da criação *in vitro*, o tamanho do centroide não apresentou diferença estatística em nenhum dos efeitos avaliados (ANOVA “individual”:  $F = 1,24$ ,  $p > 0,1$ ; lado:  $F = 0,31$ ,  $p > 0,5$ ). Com relação ao padrão de venação de asas, a ANOVA Procrustes indicou uma sutil diferença em “lado”, mas não deve ser considerada como significativa, em função da baixa magnitude do valor de “F” (“lado”:  $F = 1,71$ ,  $p < 0,05$ ). Uma diferença significativa foi verificada no efeito “individual” (“individual”:  $F = 1,49$ ,  $p < 0,0001$ ).

Com relação aos indivíduos emergidos da criação *in vivo*, o efeito “individual” não apresentou diferença estatística nem para o tamanho do centroide nem para o padrão de venação de asas. O efeito “lado” indicou uma sutil diferença em ambas as análises, mas não deve ser considerada como significativa, em função da baixa magnitude do valor de “F” (“lado: tamanho do centroide”:  $F = 4,96$ ,  $p < 0,05$ ; “lado: padrão de venação de asas”:  $F = 1,89$ ,  $p < 0,05$ ).

Tabela 4. ANOVA do tamanho do centroide e padrão de venação de asas de operárias de *Melipona scutellaris* emergidas *in vitro* e *in vivo*.

| Parâmetros                             | Efeito                  | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> |
|--|-------------------------|-----------------|----------------|
| Tamanho do centroide <sup>1</sup>      | Individual <sup>a</sup> | 7816.99         | 5833.10        |
|  | Lado <sup>b</sup>       | 1943.21         | 28047.35*      |
| Padrão de venação de asas <sup>1</sup> | Individual <sup>a</sup> | 0.00**          | 0.00           |
|  | Lado <sup>b</sup>       | 0.00*           | 0.00*          |

\*\* $P < 0,0005$

<sup>1</sup> Tamanho do centroide e o padrão de venação de asas foram analisados pela ANOVA padrão para assimetria flutuante e a ANOVA Procrustes correspondente, respectivamente. <sup>a</sup>“Individual” indica a comparação entre indivíduos sem distinção dos lados; <sup>b</sup>“Lado” representa a comparação entre os lados esquerdo e direito de um mesmo indivíduo; os números correspondem aos valores dos quadrados médios.

#### 4.2.3. Análises histológicas do cérebro de abelhas emergidas *in vivo* e *in vitro*.

Em relação à caracterização dos cérebros das abelhas recém emergidas, não foram encontradas alterações que pudessem indicar alguma diferença histológica entre os órgãos provenientes de ambos os tratamentos (*in vitro* versus *in vivo*). Sendo assim, os cérebros das abelhas emergidas *in vitro* quanto *in vivo* podem ser considerados semelhantes, uma vez que suas células apresentaram características ultraestruturais típicas semelhantes: células compactas e células não compactas, sendo as células compactas localizadas no centro do corpo pedunculado e as células não compactas nas duas laterais como mostrado na figura 11. Há também a semelhança entre as larguras das faixas de células compactas e a presença de núcleos picnóticos, o que é característica normal nos cérebros de *M. scutellaris* como visto por Grella (2017).

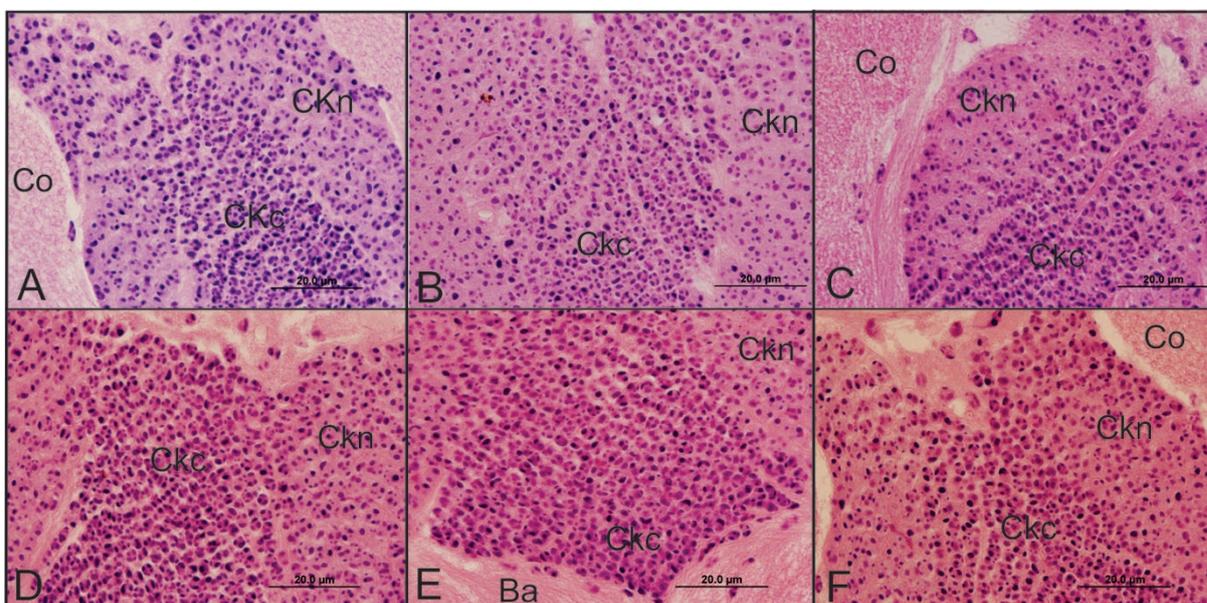


Figura 11: Cérebro de *Melipona scutellaris* recém-emergidas criadas *in vivo* e *in vitro*. (A; B e C) Corpo pedunculado de abelhas emergidas *in vitro* provenientes de 3 colônias diferentes. (D;E;F) Corpo pedunculado de abelhas emergidas *in vivo* provenientes de 3 colônias diferentes. Legenda: CKn - Células de Kenyon não compactas; CKc - Células de kenyon compactas; CK - Células de Kenyon; Co- Colar; Ba – Base.

### 4.3. CL<sub>50</sub> dimetoato

Com base nos ensaios de toxicidade, o valor de CL<sub>50</sub> determinado foi de 27,48 ng dimetoato/ $\mu$ L de dieta, sendo os limites inferiores e superiores 19,8 e 35,16 ng dimetoato/ $\mu$ L de dieta, respectivamente (Tabela 5 e Figura 12).

Tabela 5. Toxicidade oral do inseticida dimetoato para larvas de *Melipona scutellaris*. CL<sub>50</sub> - concentração letal média em ng i.a./ $\mu$ L de dieta; IC<sub>95%</sub>- Intervalo de confiança à 95%; GL- graus de liberdade; X<sup>2</sup>m - qui-quadrado modelo

| Tempo (horas) | CL <sub>50</sub> | IC 95%       | GL | X <sup>2</sup> m |
|---------------|------------------|--------------|----|------------------|
| 144           | 27,48            | 19,8 – 35,16 | 25 | 23,5             |
| 168           | 27,48            | 19,8 – 35,16 | 25 | 23,5             |

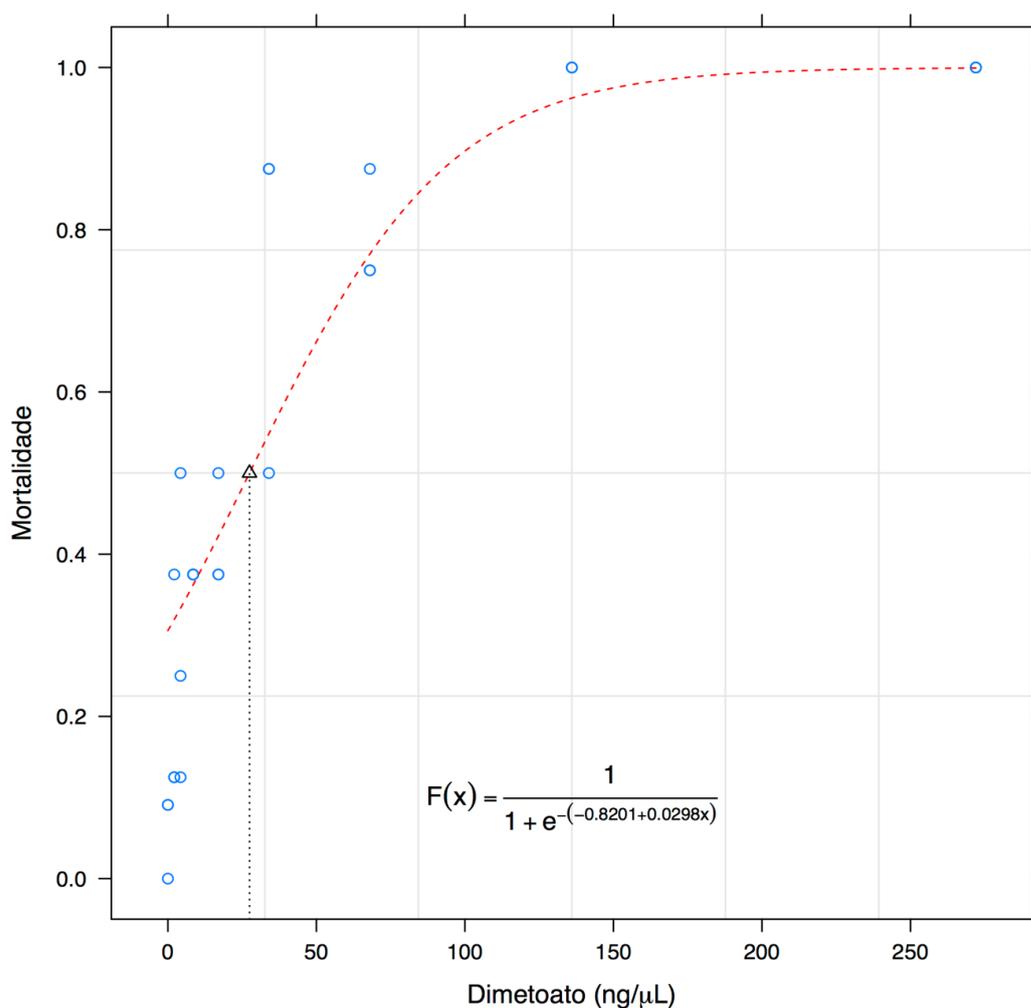


Figura 12. Toxicidade oral do inseticida dimetoato para larvas de *Melipona scutellaris*.

## 5. DISCUSSÃO

Os quatro experimentos apresentados neste trabalho foram realizados de maneira sequencial e suas taxas de sobrevivência foram aumentando gradativamente de acordo com o progresso dos experimentos, atingindo taxa de sobrevivência média de 80,2%. Outros trabalhos já realizados com larvas de abelhas sem ferrão conduzidos por Prato (2010), Menezes et al. (2013) e Rosa et al. (2016) obtiveram uma média de 76,4% de sobrevivência, o que mostra que este trabalho possui um resultado muito satisfatório e pode ser considerado representativo para futuras aplicações em bioensaios de estudos de toxicidade em abelhas sem ferrão em estágio imaturo.

De acordo com a OECD (2014), que utiliza a espécie *A. mellifera* (com método de criação já padronizado) como organismo-modelo para testes de toxicidade, a dieta contaminada deve ser oferecida às larvas do 3º ao 6º dia do período de alimentação, observando-se a mortalidade cumulativa deste o 4º até o 8º dia, período que corresponde à fase de alimentação progressiva destas abelhas. Este método corresponde ao protocolo ainda em fase final de validação, por se tratar de exposição repetida do agrotóxico às larvas. Entretanto, se formos considerar o método já validado com exposição única (OECD, 2013), a mortalidade nas placas controles não deve ultrapassar 15% entre as réplicas. Essa padronização utilizou essencialmente como base os estudos de Aupinel et al. (2005) e Aupinel et al. (2007). Em seu trabalho de padronização de método para criação *in vitro* de *A. mellifera*, Aupinel et al. (2005) obteve a maior taxa de emergência de adultos em relação às larvas foi de 69,7% e em relação às pupas de 87,34%.

Comparativamente ao protocolo da OECD e ao trabalho de Aupinel et al. (2005), o tratamento único executado com operárias de *M. scutellaris*, ou seja, a transferência de alimento e adição de NaCl ao final da alimentação, produziu resultados muito satisfatórios, acima dos estabelecidos (10,69% de mortalidade de larvas, 80,2% de emergência relativa a larvas e

87,49% em relação a pupas).

Um ponto essencial para o sucesso da criação *in vitro* é a recomendação da não utilização de ovos para transferência *in vitro*, em função das taxas de emergência terem se apresentado, em todos os casos, próximas de zero. Ovos e larvas necessitam manter contato com o ar para a respiração, o que é facilmente compreensível em grupos de abelhas que possuem aprovisionamento progressivo do alimento larval, como ocorre em *A. mellifera* e em espécie do gênero *Bombus*, e também em grupos de abelhas com aprovisionamento massivo de alimento sólido. No entanto, em abelhas sem ferrão, o alimento larval é líquido, e a posição do ovo sobre o alimento nesta consistência requereu adaptações evolutivas para este grupo (VELTHUIS, 1998). De acordo com Velthuis (1998), os ovos entram em contato com o fluido por apenas cerca de um sétimo do seu comprimento e 5% de seu volume. Dessa forma, no presente estudo, a manipulação com a agulha apícola pode ter submergido os ovos mais do que o permitido, acarretando a mortalidade ainda neste estágio de desenvolvimento.

O alto sucesso na taxa de sobrevivência também se deu devido ao uso das placas de acrílico confeccionadas especialmente para a execução desses bioensaios, pois a mesma simulava as condições reais das colônias e quando utilizadas outras placas já existente, como exemplo a placa Elisa de 96 poços a taxa de emergência era bem menor a obtida com a placa de acrílico confeccionada nas medidas ideais dos favos.

As diferenças mínimas de duração de cada fase do desenvolvimento proveniente da transferência larval provavelmente se deram pela transferência de algumas larvas com pouco mais ou pouco menos de 24 horas, que pode ocorrer devido à construção do favo que é realizada de forma discoidal com a postura de ovos pela rainha de dentro para fora (Figura 13). Sendo assim, o ovo ovipositado no centro do favo será um pouco mais velho que o das bordas do favo.



Figura 13: Forma discoidal do favo de cria de *Melipona scutellaris*.

Com relação às análises morfológicas, a comparação das medidas de distância intertegular e da largura da cabeça não apresentaram diferenças estatísticas significativa, e as caracterizações histológicas também não apresentaram diferenças na estrutura do órgão analisado (cérebro) entre abelhas emergidas *in vitro* e *in vivo*. Quanto à assimetria flutuante, o padrão de venação de asas indicou uma diferença estatística significativa no efeito “individual” no tratamento *in vitro*, o que é esperado em indivíduos na natureza, uma vez que essas variações ocorrem naturalmente em função de fatores de estresse ambiental, a exemplo de poluição, restrição na disponibilidade de alimento, etc. (KLINGENBERG, 2015). Os demais parâmetros e efeitos avaliados mostraram-se similares entre os tratamentos.

Dessa forma, os resultados gerados com *M. scutellaris*, tanto no que se refere às taxas de emergência e mortalidade quanto às análises morfológicas comparativas, permitem que as abelhas emergidas *in vitro* possam representar as abelhas emergidas *in vivo* em bioensaios. Assim, esta técnica pode ser proposta para utilização como protocolo de criação *in vitro* para indivíduos deste gênero e também adaptada para outros gêneros de abelhas sem ferrão, podendo

ser aplicada em testes toxicológicos.

A partir dos testes executados *in vitro* no presente estudo, infere-se a potencial não utilização do mesmo método *in vitro* padronizado para *A. mellifera* em abelhas sem ferrão, uma vez que seus sistemas de desenvolvimento larval diferem em vários aspectos, principalmente quando se trata de alimentação e tempo de desenvolvimento. Enquanto em *A. mellifera* a alimentação ocorre de forma progressiva, a qual consiste nas abelhas nutridoras alimentarem as crias diariamente, em abelhas sem ferrão ocorre de forma massiva, sendo o alimento depositado de uma única vez antes da oviposição da rainha (VELTHUIS, 1998). Além disso, o volume de alimento consumido pelas crias também difere entre os grupos: em *A. mellifera* cada larva consome um total de 160  $\mu\text{L}$  (AUPINEL, 2005) e na abelha sem ferrão *M. scutellaris*, cada larva ingere 130,6  $\mu\text{L}$ .

Além da quantidade de alimento ser um fator limitante para a utilização do método descrito pela OECD na criação larval dos meliponíneos, a constituição da dieta proposta não representaria o hábito alimentar dessas abelhas. O alimento larval dos meliponíneos é constituído por grande quantidade de pólen, sendo que em *Melipona marginata* este componente alcança 50% do volume do alimento larval, como verificado por Rensi (2006) e em *M. scutellaris* 31% (MENEZES et al. 2010). Já no método descrito para *A. mellifera* (AUPINEL, 2005) e utilizado pela OECD, o alimento é feito em laboratório, sendo composto por uma mistura de D-glucose, D-frutose, extrato de levedura e geleia real, sendo a geleia real produto produzido pelas abelhas da espécie *A. mellifera*, não estando presente nas colônias de *M. scutellaris*.

Outro fator que se pode citar é a diferença no tempo de alimentação, pois no método descrito por Aupinel et al. (2005) as larvas de *A. mellifera* são alimentadas por 6 dias e as de *M. scutellaris* são alimentadas uma única vez e consomem o alimento em aproximadamente 5 dias. Neste trabalho também foi percebido uma diferença de 15-20 dias no tempo total de

desenvolvimento entre as espécies. Dessa forma, evidencia-se a importância do estabelecimento de um método que atenda a criação de abelhas sem ferrão.

Outro ponto que evidencia as diferenças entre os bioensaios larvais é o fato de que o protocolo estabelecido para *A. mellifera* se utiliza de uma solução esterilizadora durante a execução dos testes, sendo essa dispensada na criação larval de abelhas sem ferrão, pois a função dessa solução é a limpeza e esterilização do material do bioensaios, contra fungos que poderiam danificar o bioensaios. Porém, para abelhas sem ferrão do gênero *Scaptotrigona*, os fungos vivem em simbiose com as larvas, como verificado por Menezes et al. (2015), impossibilitando, dessa forma, sua utilização para testes com abelhas deste grupo.

O presente estudo verificou que a  $CL_{50}$  do inseticida dimetoato para larvas da espécie *M. scutellaris* é de 27,48 ng i.a./ $\mu$ L de dieta para os tempos de 144h e 168h. A avaliação da toxicidade dos inseticidas pode ser feita de duas maneiras: a partir de testes de determinação de dose ou de concentração letal (DL e CL). Quando a quantidade de inseticida utilizada é conhecida e entra em contato apenas uma vez com o indivíduo, utiliza-se o termo DL. Quando os indivíduos são expostos ao agente químico em uma determinada concentração por um período específico de tempo, o termo mais adequado é CL (CAMPOS; ANDRADE, 2001), o que é apresentado neste trabalho.

O dimetoato é o inseticida padrão para uso em testes toxicológicos com larvas de abelhas, uma vez que a sua ação na taxa de mortalidade larval foi definida nos trabalhos realizados por Aupinel et al. (2007a; 2007b). Esse inseticida é a substância química utilizada como referência/padrão nos bioensaios toxicológicos com larvas de *A. mellifera* para a avaliação de risco dos agrotóxicos nas abelhas pela OECD (2012). Tal molécula foi escolhida devido aos testes de toxicidade por contato (DL) e oral (CL) aguda para abelhas operárias de *A. mellifera* europeia terem sido determinadas entre maio e outubro nos anos de 1981 á 1992

(63 testes de contato e 62 orais) usando métodos laboratoriais padronizados na Inglaterra e Alemanha por Gough et al. (1994), mostrando variações não significantes nas CLs e DLs.

O método aqui descrito de suma importância para a realização de futuros bioensaios toxicológicos com larvas de *M. scutellaris* podendo ser adaptado para outras espécies de abelhas sem ferrão. As larvas podem ser expostas aos inseticidas através da ingestão do alimento larval que será elaborado com os ingredientes (pólen e mel) que foram estocados no interior da colônia (BABENDREIER et al., 2004; ROTAIS, et al., 2005). Além da possibilidade de contaminação via ingestão de alimento, outra rota de exposição possível para larvas é através do contato direto que elas têm com o alimento, a cera e as abelhas que possam estar contaminados (WU et al., 2011), sendo assim o inseticida entra em contato com tegumento, podendo entrar em contato direto com a hemolinfa do indivíduo.

Portanto, este trabalho traz evidências da relevância do protocolo descrito, mostrando a diferença entre este e o método descrito para *A. mellifera*, indicando assim a importância de testes serem padronizados para abelhas sem ferrão, devido à diferença em sua biologia e, principalmente, devido à diferença na alimentação, tanto por quantidade de alimento, quanto por modo de alimentação.

Essa proposta é essencial, pois, de acordo com a OECD, para a validação de um método e para que o mesmo seja considerado como protocolo validado, vários laboratórios em diferentes localidades devem desenvolver a mesma proposta (chamada de “ring-tests”), a fim de se encontrar os mesmos resultados.

## 6. CONCLUSÃO

O protocolo descrito no presente estudo para *M. scutellaris* apresentou taxas de desenvolvimento satisfatórias, bem como produziu operárias recém emergidas com dimensões semelhantes às produzidas em condições naturais, possibilitando dessa forma, sua utilização em testes de toxicidade. Outra evidência da relevância do método para esta espécie e dos demais que estão sendo produzidos é que podemos notar a diferença entre este o método descrito *A. mellifera*, mostrado assim a importância de testes serem padronizados para abelhas sem ferrão, devido à diferença em sua biologia e, principalmente, devido à diferença na alimentação, tanto por quantidade de alimento, quanto por modo de alimentação.

Estes resultados são os primeiros passos para uma proposta de desenvolvimento de “ring-tests” entre diferentes laboratórios para que, num futuro próximo, possa ser levado como proposta para a inclusão deste grupo de abelhas como protocolo na OECD.

## 7. REFERÊNCIAS

AUPINEL, P.; FORTINI, D.; DUFOUR, H.; TASEI, J.-N.; MICHAUD, B.; ODOUX, J.-F.; PHAM-DELEÈGUE, M. Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, v.58, n.2, p.107-111, 2005.

AUPINEL, P.; FORTINI, D.; MICHAUD, B.; MAROLLEAU, F.; TASEI, J.-N.; ODOUX, J.-N. Toxicity of dimetoate and fenoxycarb to honeybee brood (*Apis mellifera*) using a new *in vitro* standardized feeding method. **Pest Management Science**, v.63, n.11, p.1090-1094, 2007.

BABENDREIER, D.; KALBERER, N.; ROMEIS, A.; FLURI, P.; BIGLER, F. Pollen consumption in honeybee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, v.35, n.3, p.293-300, 2004.

BOSCH, J.; VICENS, N. Body size as an estimator of production costs in a solitary bee. **Ecological Entomology**, v. 27, n.2, p.129-137, 2002.

BRITAIN, C; POTTS, S. G; The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, v.12, p.321–331, 2011.

CAMARGO, C.A. Determinação de castas em *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Biologia**, n.32, p. 133-138, 1972.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. (2013). Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Recuperado em 21 outubro, 2015, **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region** - online version Web site: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>, 2013.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5.ed. New York: Elsevier Publishing, 1998. 789p.

- COSTA, E. M., ARAUJO, E. L., MAIA, A. V., SILVA, F. E., BEZERRA, C. E., & SILVA, J. G. Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie**, 45(1), 34-44, 2014.
- COSTA, M. Padrões de assimetria ao longo da distribuição geográfica de *Drosophila antonietae* Tindon-Sklorz & Sene, 2008.
- CRESSWELL, J. E., PAGE, C. J., UYGUN, M. B., HOLMBERGH, M., Li, Y., WHEELER, J. G.; TYLER, C. R. Differential sensitivity of honey bees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). **Zoology**, 115(6), 365-37, 2012.
- CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. **São Paulo: Ed. UNESP**. 416p. 2009.
- DIVELY, G. P., EMBREY, M. S., KAMEL, A., HAWTHORNE, D. J., & PETTIS, J. S. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. **PLoS One**, 10(3), e0118748, 2015.
- DONGEN, S. V. Fluctuating asymmetry and developmental instability in evolutionary biology: past, present and future. **Journal of evolutionary biology**, v.19, n..6, p. 1727-1743, 2006.
- FAHRBACH, S. E. Structure of the mushroom bodies of the insect brain. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v.51, p.209-232. 2006.
- FARRIS, S. M. Evolution of insect mushroom bodies: old clues, new insights. **Arthropod Structure & Development**, Oxford, v. 34, n.3, p. 211-234, 2005.
- GIANNINI, T. C., CORDEIRO, G. D., FREITAS, B. M., SARAIVA, A. M., & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, tov093. 2015.

GOUGH, H.J.; MC INDOE, E.C.; LEWIS, G.B.. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity test on honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Apicultural Research**, v.33, n.119, p.15-25, 1994.

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

HARTFELDER, K.; MAKERT, G. R.; JUDICE, C. C.; PEREIRA, G. A.; SANTANA, W.C.; DALLACQUA, R.; BITONDI, M. M. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. **Apidologie**, v. 37, p. 144, 2006.

HAYDAC, M.H. Honey bee nutrition. **Annual Review of Entomology**, v.15, p.143-156, 1970.

HEARD, T. A. the Role of Stingless Bees in Crop Pollination. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 131, p. 183–206, 1999.

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/notatecnicaavaliacaoderiscoagrototoxicos.pdf>>. Acessado em 30 junho 2017

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

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; JONG, D. DE. Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. In: **HOLOS**. Ribeirão Preto. **Holos**, 2006. p. 96.

JACOB, C. R., SOARES, H. M., NOCELLI, R. C., & MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science**, 71(1), 114-122, 2015.

JUNQUEIRA LCU, JUNQUEIRA LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. **São Paulo: Editora Santos**, 123 p. 1983.

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

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

KESSLER, S. C., TIEDEKEN, E. J., SIMCOCK, K. L., DERVEAU, S., MITCHELL, J., SOFTLEY, S., WRIGHT, G. A. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, 2015.

KLATT, B. K. **Bee Pollination of Strawberries on Different Spatial Scales-from Crop Varieties and Fields to Landscapes**. (Doctoral dissertation, Niedersächsische Staats-und Universitätsbibliothek Göttingen). 2013.

KLEIN, A.M.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; KREMEN, C.; WILLIAMS, N.M.; THORP, R.W. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v. 99, n. 26, p. 16812-16816, 2002.

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

LIMA, M. A. P, et al. Lack of lethal and sublethal effects of Cry1Ac Bt-toxin on larvae of the stingless bee *Trigona spinipes*. **Apidologie**, v.44, n.1, p. 21-28, 2013.

LIMA, M. A. P., et al. Does Cry1Ac Bt-toxin impair development of worker larvae of Africanized honey bee?. **Journal of applied entomology**, v.135, n.6, p. 415-422, 2011.

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.

- MENEZES, 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.
- MICHENER, C. D. **The bees of the world**. John Hopkins, Baltimore. p. 913, 2000.
- MICHENER, C.D. **Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees**, 2013.
- NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: **Nogueirapis**, 445 p. 1997.
- NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 140-151. 2010.
- OECD GUIDELINES FOR TESTING CHEMICALS. **Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure**. Draft, 2012.
- OECD. Guidelines for the testing of chemicals. **Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure**, n. 237, 2013.
- PRATO, M. **Ocorrência natural de sexuais, produção in vitro de rainhas e multiplicação de colônias em *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Dissertação de Mestrado, Entomologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- RIBI, W.; SENDEN, T.J.; SAKELLARIOU, A.; LIMAYE, A.; ZHANG, S. Imaging honeybee brain anatomy with micro-x-ray-computed tomography. **Journal of Neuroscience Methods**, v.171, n.1, p.93-97, 2008.
- RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M. P.; TOUFFET - BRIENS, F. Modes of honeybee exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, p. 71-83, 2005.

ROSA, A.S.; TEIXEIRA, J.S.G.; VOLLET-NETO, A.; QUEIROZ, E.P.; BLOCHTEIN, B.; PIRES, C.S.S.; IMPERATRIZ-FONSECA. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. **Apidologie**. 47, 729-738, 2016.

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

ROUBIK, D.W. Seasonality in colony food storage, brood production and adult survivorship - studies of *Melipona* in tropical forest (Hymenoptera, Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 55, p. 789-800, 1982.

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

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

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

SOUZA, T. F. **Efeitos das doses subletais do fipronil para abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) por meio de análises morfológicas e comportamentais**. 2009.38 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) -Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

THOMPSON, H. M., WILKINS, S., HARKIN, S., MILNER, S., & WALTERS, K. F. Neonicotinoids and bumblebees (*Bombus terrestris*): effects on nectar consumption in individual workers. **Pest Management Science**, v. 71, p. 946-950, 2014.

TOMÉ, H. V. V., MARTINS, G. F., LIMA, M. A. P., CAMPOS, L. A. O., GUEDES, R. N. C Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native

stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PLoS One**, v.7, n.6 , e38406, 2012.

VELTHUIS, B. J. & VELTHUIS, H. H. W. Columbus surpassed. Biophysical aspects of how stingless bees place an egg upright on their liquid food. **Naturwiss**, v. 85, p. 330-333,1998.

VIANA, B. F., et al. STINGLESS BEES FURTHER IMPROVE APPLE POLLINATION AND PRODUCTION. **Journal of Pollination Ecology**, p.14, 2014.

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