

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/03/2020.

---

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*

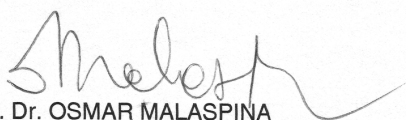
**AUTORA: ADNA SUELEN DORIGO**

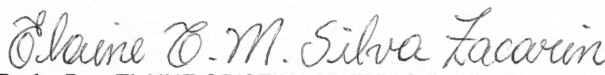
**ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA**

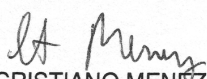
**COORIENTADORA: ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI**

**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.

## 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.