RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 26/08/2024.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

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

Avaliação morfológica e bioquímica em abelhas recém emergidas da espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille 1807 (Hymenoptera, Apidae), expostas a clotianidina durante a fase larval

Isabella Fernanda Camargo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus 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, Molecular e Microbiologia).

Rio Claro - SP
2022

Isabella Fernanda Camargo

Avaliação morfológica e bioquímica em abelhas recém emergidas da espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille 1807 (Hymenoptera, Apidae), expostas a clotianidina durante a fase larval

Orientadora: Profª. Drª Roberta C. Ferreira Nocelli
Coorientadora: Drª Annelise de Souza Rosa-Fontana

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus 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, Molecular e Microbiologia).

Rio Claro - SP
2022

C172a

Camargo, Isabella Fernanda

Avaliação morfológica e bioquímica em abelhas recém emergidas da espécie Scaptotrigona postica, Latreille 1807 (Hymenoptera, Apidae), expostas a clotianidina durante a fase larval / Isabella Fernanda Camargo. -- Rio Claro, 2022

89 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Coorientadora: Annelise de Souza Rosa-Fontana

1. Abelhas nativas. 2. Agrotóxico. 3. Criação in vitro. 4. Análises morfológicas e bioquímicas. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação morfológica e bioquímica em abelhas recém emergidas da espécie Scaptotrigona postica, Latreille 1807 (Hymenoptera, Apidae), expostas a clotianidina durante a fase larval

AUTORA: ISABELLA FERNANDA CAMARGO
ORIENTADORA: ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI
COORIENTADORA: ANNELISE DE SOUZA ROSA FONTANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI (Participaçao Presencial)
Departamento de Ciencias da Natureza Matematica e Educacao / UFSCar - Araras

Profa. Dra. DAIANA ANTONIA TAVARES (Participaçao Presencial)
Pós-Doutoranda do Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participaçao Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Rio Claro, 26 de agosto de 2022

À minha avó materna, Maria Fátima (in memoriam), que sempre teve muito orgulho de mim e adorava perguntar sobre a minha pesquisa com as abelhas....

AGRADECIMENTOS

Para mim, a conclusão deste trabalho foi muito mais além do que qualquer realização profissional. Não me tornou apenas uma cientista, mas me ensinou o significado da palavra superação, como ser humano que possui limitações, dificuldades e que pode superar qualquer barreira.

Além dos ofícios desenvolvidos como pesquisadora, dar andamento em uma pesquisa durante uma pandemia e em tempos sombrios para a ciência, foi um trabalho árduo, mas extremamente gratificante ao terminar. As relações humanas construídas ao decorrer deste trabalho me mantiveram de pé quando dias difíceis se fizeram presentes, e quando pessoas amadas foram brilhar no céu (mas também teve espaço para muito aprendizado e momentos felizes).

Assim sendo, sou imensamente grata pela oportunidade de realizar esse mestrado e concretizar mais um sonho na minha carreira. Com isso, deixo o meu agradecimento especial a todos aqueles que fizeram parte desta etapa na minha vida:

A Deus, por ter me fortalecido nos momentos mais difíceis, e por ser meu alicerce.

A minha família, em especial aos meus pais, aos meus irmãos, as minhas avós, principalmente a Maria Fátima (in memoriam), ao meu tio Célio e ao Davi Alcantara, por toda paciência, apoio e companheirismo.

À professora Dra Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela orientação, paciência, pela empatia e compreensão, pelo auxílio desde o meu segundo ano de graduação e, principalmente, por ter me inspirado a ser cientista.

À professora Dr. Annelise de Souza Rosa-Fontana, pela coorientação, pelas conversas tranquilizadoras, por todo apoio durante os trabalhos que desenvolvi, pelas risadas e especialmente pela paciência também.

Ao professor Dr. Osmar Malaspina, por ter me recebido de portas abertas e me assegurado todo suporte técnico para desenvolver este trabalho.

À Tatiane Caroline Grella, por compartilhar o seu conhecimento sempre que possível, por me ajudar e me socorrer inúmeras vezes respondendo as minhas dúvidas e, principalmente, por todo o auxílio que me deu para que eu desenvolvesse este trabalho.

À Rafaela Tadei, pela disponibilidade para me auxiliar com os scripts do R e por todos os ensinamentos de estatística.

Ao Caio Eduardo da Costa Domingues, pela amizade, paciência e por todos os ensinamentos e conselhos, mesmo do outro lado do mundo.

À Geovana Maloni, pelo aprendizado compartilhado, pela companhia durante a produção de soluções padrões e demais técnicas para a realização deste trabalho.

À Adna Dorigo, por ter feito parte da minha trajetória e por ter me auxiliado milhares de vezes sempre que precisei.

Aos membros do LECA, que foram essenciais ao meu aprendizado e para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente a Daiana, pelos ensinamentos de enzimática.

A seção técnica de pós-graduação do IB, especialmente ao Felipe e a Eliana, por todo o profissionalismo e paciência para me responder sempre que possível, me auxiliando com todas as questões burocráticas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos: 2017/21097-3; 2019/20109-3) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro à pesquisa realizada (Processo: 400540/2018-5).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho e não foram mencionados aqui.

“A vida não é tanto sobre o que você conquista, mas sobre o que você supera”.

- Robin Roberts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 16

2. OBJETIVO GERAL E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO 24

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 25

4.CAPÍTULO 1 32

4.1. INTRODUÇÃO 32
4.2. OBJETIVO GERAL 34
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 35
4.4. MATERIAL E MÉTODOS 35
4.5. RESULTADOS 39
4.6. DISCUSSÃO 46
4.7. CONCLUSÃO 50
4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 51

5.CAPÍTULO 2 55

5.1. INTRODUÇÃO 55
5.2. OBJETIVO GERAL 60
5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 60
5.4. MATERIAL E MÉTODOS 60
5.5. RESULTADOS 68
5.6. DISCUSSÃO 76
5.7. CONCLUSÃO 82
5.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

6. CONCLUSÕES GERAIS 91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das estruturas químicas dos neonicotinoides utilizados no Brasil, com ênfase na clotianidina.....**Pág.19**

Figura 2. Representação das placas de criação in vitro dispostas em estufa incubadora B.O.D, a 28,7 Cº e umidade de 95±5% nos primeiros dias.....**Pág.38**

Figura 3. Progressão do desenvolvimento larval de *S. postica*.....**Pág.40**

Figura 4. Fases de desenvolvimento no período pupal.....**Pág.40**

Figura 5. Tempo em que os indivíduos atingiram o 5ª instar larval.....**Pág.42**

Figura 6. Tempo em que os indivíduos defecaram.....**Pág.43**

Figura 7. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho branco.....**Pág.43**

Figura 8. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho rosa.....**Pág.44**

Figura 9. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho marrom.....**Pág.44**

Figura 10. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho preto.....**Pág.45**

Figura 11. Tempo em que os indivíduos emergiram.....**Pág.45**

Figura 12. Abelhas jovens emergindo das células de cria artificiais.....**Pág.63**

Figura 13. Representação dos órgãos dissecados e fixados diretamente em paraformaldeído 4%..... **Pág.64**

Figura 14. Fotomicrografias das estruturas de tecido e alterações no intestino médio de *S. postica*..... **Pág.71**

Figura 15. Fotomicrografias das estruturas de tecido e alterações nos túbulos de Malpighi de *S. postica*..... **Pág.72**

Figura 16. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da carboxilesterase 3 em abelhas *S. postica*..... **Pág.74**

Figura 17. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glutationa-S-transferase em abelhas *S. postica*..... **Pág.74**

Figura 18. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase em abelhas *S. postica*..... **Pág.75**

Figura 19. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glutationa peroxidase em abelhas *S. postica*..... **Pág.75**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mortalidade da fase larval, taxa de pupação e taxa de emergência com relação a larvas e pupas (média ± erro padrão) de *S. postica*.....**Pág.41**

Tabela 2: Alterações e pontuações atribuídas a cada um dos órgãos analisados.....**Pág.66**

Tabela 3. Valores da média e erro padrão das alterações encontradas no intestino médio de recém emergidas expostas a clotianidina..... **Pág.69**

Tabela 4. Valores da média e erro padrão das alterações encontradas nos túbulos de Malpighi de recém emergidas expostas a clotianidina..... **Pág.69**

RESUMO

O Brasil é o país com maior biodiversidade de abelhas sem ferrão do mundo. Dentre as espécies, *Scaptotrigona postica* desempenha papel fundamental nos serviços de polinização de plantas nativas e cultivadas. No entanto, a saúde das populações desses polinizadores está sendo ameaçada devido a múltiplos fatores, dentre eles, o uso intensivo de agrotóxicos. Esses compostos químicos chegam à colmeia por meio de abelhas forrageiras e, uma vez lá, podem ser ingeridos pelas larvas durante a alimentação. No Brasil são utilizados diferentes grupos de agrotóxicos, entre eles a clotianidina, um ingrediente sistêmico, cujos efeitos são desconhecidos em larvas e adultos de abelhas *S. postica*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo compreender os possíveis impactos da clotianidina por meio da: (I) investigação dos efeitos de concentrações realísticas de campo, na sobrevivência e desenvolvimento de larvas e adultos de abelhas *S. postica*; (II) avaliação da toxicidade deste inseticida na morfologia de tecidos de órgãos de metabolização de substâncias (intestino e túbulos de Malpighi) de recém emergidas; e (III) análise da atividade de enzimas relacionadas a desintoxicação (Carboxilesterase 3 – CaEs-3 e Glutationa-S-transferase - GST) e enzimas antioxidantes (Glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PD e Glutationa peroxidase - GPx), nos órgãos supracitados de abelhas recém emergidas. Para que os objetivos fossem alcançados, foram realizadas sucessivas diluições no alimento para atingir as concentrações de clotianidina a serem oferecidas às larvas: 1 ng i.a./µL (concentração de campo) e 0,1 ng i.a./µL (concentração de campo/10), o alimento puro foi oferecido ao grupo controle. Após a distribuição do alimento (25 µL/larva) em placas de acrílico, larvas de primeiro instar foram coletadas e transferidas. Para os bioensaios in vitro, os efeitos foram observados de acordo com a progressão das fases de desenvolvimento: 5ª instar larval; defecação; taxa de mortalidade; taxa de pupação; taxa de emergência; mudança na coloração de olhos das pupas e; tempo em cada fase de desenvolvimento. Para as análises de alterações morfológicas, lâminas contendo secções dos órgãos sob coloração de hematoxilina e eosina foram analisadas. Para cada alteração observada foi levado em consideração o índice de relevância dos danos patológicos nos órgãos. Já para as análises de modulação da atividade das enzimas, os grupos expostos foram individualmente comparados com o grupo controle e diferenças significativas foram consideradas. Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas no software RStudio. Os resultados

demonstraram que a clotianidina afetou significativamente as taxas de sobrevivência, pupação e emergência das abelhas em ambos os grupos expostos, quando comparados ao controle. O tempo em cada fase de desenvolvimento apresentou significância estatística para o 5ª instar larval e defecação. Não houve diferença no tempo entre os grupos no período pupal, apenas em pupa de olho marrom, demonstrando que a clotianidina foi mais tóxica no período larval do que pupal. Os resultados das alterações morfológicas demonstraram que a clotianidina danificou severamente os órgãos analisados nos grupos expostos. Foram observadas alterações como perda de material citoplasmático; perda de borda em escova; aumento da eliminação de células para o lúmen; perda de ninhos de células regenerativas; inchaço celular e picnose. Já com relação aos resultados de atividade enzimática, a concentração de campo de clotianidina modulou diferencialmente a atividade das enzimas CaEs-3, GST e G6PD, com exceção da GPx. Os resultados obtidos são inéditos e contribuem para o desenvolvimento de medidas protetivas para a conservação da *S. postica*, uma vez que este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da exposição larval a clotianidina para essa espécie de abelha. Desse modo, esse trabalho fornece dados relevantes a serem incluídos nas investigações do IBAMA e nos esquemas de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas sem ferrão.

Palavras-chave: Neonicotinoide, meliponíneos, criação *in vitro*, danos morfológicos, atividade enzimática.

ABSTRACT

Brazil is the country with the greatest biodiversity of stingless bees in the world. Among the species, *Scaptotrigona postica* plays a fundamental role in the pollination services of native and cultivated plants. However, the health of populations of these pollinators is being threatened due to multiple factors, among them, the intensive use of pesticides. These chemical compounds reach the hive through forager bees and, once there, can be ingested by the larvae during feeding. In Brazil, different groups of pesticides are used, including clothianidin, a systemic ingredient whose effects are unknown in larvae and adults of *S. postica* bees. Thus, the present study aimed to understand the possible impacts of clothianidin through: (I) investigation of the effects of realistic field concentrations on the survival and development of larvae and adults of *S. postica* bees; (II) evaluation of the toxicity of this insecticide in the morphology of tissues of substances metabolizing organs (intestine and Malpighian tubules) of newly emerged; and (III) analysis of the activity of detoxification-related enzymes (Carboxylesterase 3 - CaEs-3 and Glutathione-S-transferase - GST) and antioxidant enzymes (Glucose-6-phosphate dehydrogenase - G6PD and Glutathione peroxidase - GPx) in aforementioned organs of newly emerged bees. To achieve the objectives, successive dilutions were carried out in the food to reach the concentrations of clothianidin to be offered to the larvae: 1 ng a.i./µL (field concentration) and 0.1 ng a.i./µL (field concentration/10), pure food was offered to the control group. After distributing food (25 µL/larva) on acrylic plates, first instar larvae were collected and transferred. For the in vitro bioassays, the effects were observed according to the progression of the developmental stages: 5th larval instar; defecation; mortality rate; pupation rate; emergency fee; change in pupae eye color and time at each stage of development. For the analysis of morphological changes, slides containing sections of the organs stained with hematoxylin and eosin were analyzed. For each observed alteration, the relevance index of pathological damage to the organs was considered. For the analysis of enzyme activity modulation, the exposed groups were individually compared with the control group and significant differences were considered. The data obtained were submitted to statistical analysis in the RStudio software. The results showed that clothianidin significantly affected the survival, pupation and emergence rates of bees in both exposed groups when compared to the control. The time in each developmental stage was statistically significant for the 5th larval instar and defecation. There was no difference in time between groups in the pupal period,

only in brown-eyed pupae, demonstrating that clothianidin was more toxic in the larval period than in the pupal period. The results of the morphological alterations showed that clothianidin severely damaged the organs analyzed in the exposed groups. Changes such as loss of cytoplasmic material were observed; brush edge loss; increased clearance of cells into the lumen; loss of regenerative cell nests; cellular swelling and pyknosis. Regarding the enzymatic activity results, the clothianidin field concentration differentially modulated the activity of the CaEs-3, GST and G6PD enzymes, except for GPx. The results obtained are unprecedented and contribute to the development of protective measures for the conservation of *S. postica*, since this study is the first to assess the effects of larval exposure to clothianidin for this bee species. Thus, this work provides relevant data to be included in IBAMA investigations and in the environmental risk assessment schemes of pesticides for stingless bees.

Keywords: Neonicotinoid; meliponines; *in vitro* creation; morfological damage; enzymatic activity.

1.INTRODUÇÃO GERAL

A perpetuação da vida no planeta carece de alguns processos biológicos essenciais. Esses processos têm elevado grau de importância, uma vez que auxiliam a manter a diversidade, abundância e a atividade de diferentes tipos de organismos nos ecossistemas. Um ecossistema é um complexo dinâmico de comunidades de plantas, animais, micro-organismos e o ambiente não vivo interagindo como uma unidade funcional. Os seres humanos são parte integrante dos ecossistemas. Já os serviços ecossistêmicos são benefícios que os seres humanos obtêm dos ecossistemas. A polinização é um exemplo claro de um serviço ecossistêmico regulatório (DAILY, 1997; Millennium Ecosystem Assessment 2003; 2005).

Os serviços de polinização integram esses processos biológicos indispensáveis, visto que desempenham um papel fundamental na manutenção e no equilíbrio da vida na Terra. A eficiência desses serviços na reprodução da maioria das espécies vegetais impacta, diretamente, na formação de frutos e sementes e promove a variabilidade genética em decorrência do cruzamento das plantas com flores. Estima-se que cerca de 75% das principais fontes de alimento no Brasil, e quase 90% das angiospermas no mundo, dependem, em algum grau, da transferência de pólen por animais (HEITHAUS, 1974; KEVAN; VIANA, 2003; IMPERATRIZ-FONSECA, 2004; IPBES, 2017; BPBES, 2019).

Dentre os agentes polinizadores, as abelhas são as mais frequentes devido a sua abundância e dependência das flores para alimentação, sendo as mais reconhecidas e principais responsáveis por polinizar plantas nativas e cultivadas. O serviço prestado por esses insetos auxilia no funcionamento contínuo dos ecossistemas naturais e agroecossistemas, tem papel imprescindível na perpetuação da fauna e flora e traz inúmeros benefícios para a sociedade (WRATTEN *et al.,* 2012; KLEIN *et al.,* 2007; IMPERATRIZ-FONSECA; JOLY, 2017; IPBES, 2017; ARIOLI *et al*., 2017; BPBES, 2019).

Além da relevância ecológica, a abundância de abelhas em paisagens agrícolas promove maior rendimento na produção de diversas culturas, tais como o girassol, morango e melão (ROUBIK, 2018; PERROT *et al*., 2019). Giannini *et al*. (2015) revisaram a dependência de cultivos por abelhas no Brasil, e de 141 culturas

85 foram identificadas como dependentes desses agentes tão importantes. Além disso, o valor anual dos serviços de polinização na produção de alimentos é equivalente a R$43 bilhões na economia brasileira, sendo a soja, café, maçã e laranja os detentores dos maiores valores anuais de produção (BPBES, 2019).

O Brasil abriga mais de 2.500 espécies de abelhas já classificadas e distribuídas em cinco famílias. A família Apidae inclui a fauna de abelhas sem ferrão, grupo de hábito social com maior diversidade em território brasileiro. São encontradas aproximadamente 244 espécies descritas, pertencentes a 29 gêneros, e cerca de 87 são endêmicas no Brasil, correspondendo a 20% das espécies estimadas de abelhas sem ferrão neotropicais (SILVA *et al*., 2014; PEDRO, 2014). As mais reconhecidas pertencem a tribo Meliponini e, assim como as abelhas de gênero *Apis*, possuem organização eussocial. No entanto, existem muitas lacunas de conhecimento sobre a maioria das espécies não-*Apis* que ainda precisam ser preenchidas (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004; MICHENER, 2013; IBAMA, 2017). Em virtude dessa escassez de dados, salienta-se a importância de estudos com espécies nativas sem ferrão.

Dentre essas espécies, *Scaptotrigona postica* (LATREILLE, 1807) (Hymenoptera: Apidae), pertence ao grupo de meliponíneos que vivem em ocos de árvores. Conhecida como abelha Mandaguari, possui ampla distribuição geográfica por todo o território brasileiro, incluindo o Estado de São Paulo. (KERR, *et al*., 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; CAMARGO; PEDRO, 2013). A espécie em questão, realiza um importante papel na polinização de plantas nativas do Brasil, como por exemplo, a *Campomanesia pubescens*, conhecida popularmente como gabiroba. O fruto produzido pela planta é o terceiro alimento mais abundante e o segundo mais ocorrente na alimentação do lobo-guará. Além desse fruto, *S. postica* também é responsável por polinizar umbu, juá-fruta, murta e café (JUNIOR MOTTA, 2000; MICHALSKI; BARBOLA; LUZ, 2013; BPBES, 2019).

Devido a relevância desses polinizadores para a diversidade de plantas e para a produção de alimentos no Brasil, esses insetos vêm sendo cada vez mais reconhecidos e destacados, principalmente em estudos que avaliam os impactos do crescimento e da intensificação agrícola no país. Tais práticas promovem a fragmentação de habitats naturais, a perda da flora nativa e o aumento no uso de agrotóxicos. Em vista disso, as fontes de alimento e os locais para nidificação das abelhas são altamente afetados, prejudicando a riqueza de algumas espécies

(IMPERATRIZ-FONSECA, 2004; CEPEA, 2014; GOULSON *et al*., 2015; KLEIN *et al*., 2017).

Diante desse cenário, a diversidade e a saúde das populações de abelhas estão sendo ameaçadas, o que implica em múltiplos impactos, tanto ecológicos quanto econômicos (KREMEN, 2004). Uma das possíveis causas para o declínio de abelhas é o uso intensivo de agrotóxicos (BLACQUIÈRE *et al*., 2012). Uma vez que ao realizarem os serviços de polinização, especialmente em áreas agrícolas, esses insetos estão suscetíveis a ação de substâncias amplamente utilizadas para o controle de pragas nas culturas, tanto por exposição tópica quanto por ingestão de recursos contaminados com resíduos de agrotóxicos (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006; GOULSON *et al*., 2015; KLEIN *et al.*, 2017).

De acordo com o relatório anual de comercialização de agrotóxicos no Brasil, em 2020 foram comercializadas 685.745,68 toneladas de ingredientes ativos no país. O Sudeste foi a terceira região que mais comercializou agrotóxicos: do total de 143.665,39 toneladas, cerca de 88.954,49 foram comercializadas pelo Estado de São Paulo, o qual lidera o ranking de comercialização de substâncias na região Sudeste, ultrapassando Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (IBAMA, 2020).

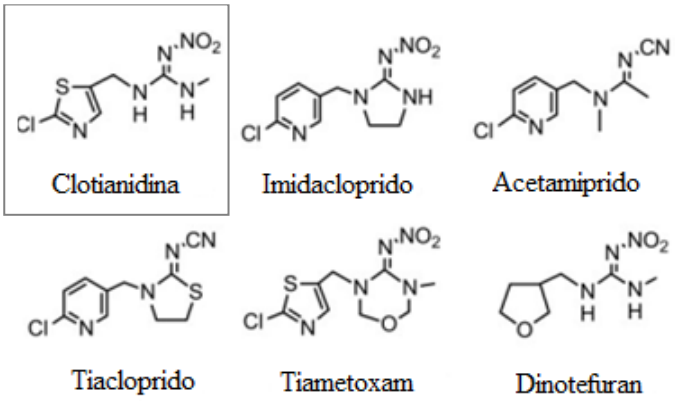
Dentre os diferentes grupos de substâncias comercializadas, estão os neonicotinoides, inseticidas de ação neurotóxica para insetos. Esses compostos atuam como agonistas da acetilcolina ligando-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) nos insetos, localizados nos neurônios pós-sinápticos, causando hiperexcitação do sistema nervoso e levando o indivíduo a morte (BUCKINGHAM *et al*., 1997; SUCHAIL *et al*., 2004).

Os neonicotinoides possuem característica sistêmica e podem ser translocados por meio dos vasos condutores de seiva. Dessa forma, a substância pode ser encontrada em todas as partes da planta, incluindo o pólen e néctar das flores, que é uma via de exposição às abelhas. Em consequência desse fator, as operárias forrageiras podem coletar recursos contaminados com inúmeras dessas substâncias e, ao levarem até a colônia, todos os indivíduos são afetados, incluindo as larvas (JAY, 1986; BLACQUIÈRE *et al*., 2012).

No Brasil destaca-se a utilização de seis tipos de neonicotinoides: acetamiprido, clotianidina, dinotefuram, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam

(Figura 1). Sabe-se que a clotianidina é o metabólito do tiametoxam, e possui classificação ambiental III (Produto perigoso ao meio ambiente). Atualmente, dois produtos formulados para tratamento de sementes contém o ingrediente ativo clotianidina e são comercializados para controlar insetos praga nas culturas de soja, milho e algodão. (NAUEN, *et al*., 2003; RANCAN; ROSSI; SABATINI, 2006; BRASIL-MAPA, 2022).

Figura 1. Representação das estruturas químicas dos principais neonicotinoides utilizados no Brasil, com ênfase na clotianidina.



Fonte: Adaptado de UCHIGASHIMA *et al*. (2012)

As abelhas podem ser expostas a produtos formulados a base desses inseticidas por meio de dois cenários de exposição: na área tratada (in crop), e em áreas adjacentes (off crop = fora da área tratada). A aplicação do produto ocorre diretamente na área tratada, mas as áreas adjacentes, que não fazem parte dos cultivos agrícolas, podem ser atingidas pela aplicação do produto na área tradada (IBAMA, 2017). Em vista disso, espécies de abelhas silvestres de gênero não-*Apis,* como a *S.postica,* podem ser expostas tanto nas áreas in crop quanto off crop

Diversos estudos na literatura demonstraram a presença de neonicotinoides em recursos florais, como pólen e néctar das flores de culturas agrícolas, tratados especialmente com produtos comerciais formulados a base desses inseticidas, incluindo a clotianidina. (BYRNE *et al*., 2014; DIVELY; KAMEL, 2012; POHORECKA *et al*., 2012; SCHMUCK *et al*., 2001; STONER; EITZER, 2012). Mas pouco se sabe sobre como esses produtos podem afetar a saúde de abelhas sem ferrão, uma vez que a maior parte dos dados disponíveis na literatura foram produzidos para abelhas de gênero *Apis*.

Kasiotis *et al*. (2014), encontraram uma grande quantidade de clotianidina em pólen coletado por abelhas *A. mellifera*. No referido trabalho, cerca de 50% das amostras analisadas continham esse composto. Tadei *et al*. (2019) também observaram que os impactos da clotianidina em larvas e adultos de abelhas *A. mellifera* são muito severos, diminuindo drasticamente a longevidade das abelhas. Além disso, as larvas expostas à clotianidina, via alimentação, apresentaram efeitos após a emergência, como a redução dos padrões de sobrevivência das abelhas, o que pode prejudicar e comprometer a dinâmica da colônia.

Na maioria dos casos, os efeitos causados por baixas concentrações de agrotóxicos não levam à morte imediata, mas têm o potencial para afetar o comportamento e a fisiologia a longo prazo. Em concentrações subletais, os neonicotinoides podem afetar a memória, gerar problemas crônicos e aumentar os efeitos de patógenos em larvas e adultos de abelhas, comprometendo a capacidade do indivíduo de combater as patologias (FRAZIER *et al*., 2008; WHITEHORN *et al*., 2012). Apesar do órgão alvo ser o sistema nervoso, quando estes compostos são ingeridos, entram em contato primeiramente com os órgãos do sistema digestório e excretor (intestino e túbulos de Malpighi), os quais atuam para barrar os processos de intoxicação (LAVINE; STRAND, 2002; CRUZ-LANDIM, 2009; ROSSI, 2011; CATAE *et al*., 2014.

O trato digestório dos insetos é um tubo alimentar dividido em três partes: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (SNODGRASS, 1956). Possui formato de arco na cavidade abdominal, e apresenta células digestivas que possuem um importante papel na produção de enzimas. Essas células são as mais afetadas por substâncias tóxicas e patogênicas, especialmente por possuírem maior contato com o alimento que é ingerido (CRUZ-LANDIM, 1999; CAESTANO *et al*., 1994; SERRÃO, 1995).

Os túbulos de Malpighi são extensões finas conectadas ao trato intestinal, mais especificamente entre o intestino médio e o intestino posterior. Após a digestão do alimento pelo intestino, as substâncias absorvidas passam para a hemolinfa e, então, podem chegar aos túbulos de Malpighi para a excreção. Os túbulos possuem um papel fundamental durante os processos de desintoxicação, especialmente por agirem na excreção de substâncias não metabolizadas ou em excesso no organismo das abelhas. (NOCELLI, *et al*., 2016). Ao receber as moléculas dos agrotóxicos, ingeridas pelas abelhas, os órgãos podem apresentar alterações morfológicas e

bioquímicas induzidas por esses contaminantes ambientais (THIBOLDEAUX *et al*. 1998; SOROUR 2001; NOCELLI *et al*., 2012).

Uma das maneiras de investigar os efeitos da clotianidina nos órgãos, é por meio de análises morfológicas e bioquímicas. As análises de alterações morfológicas são importantes pois indicam se as células do trato digestório das abelhas estão sofrendo danos em decorrência da exposição ao inseticida (SILVA-ZACARIN *et al*., 2010). Diversos trabalhos observaram alterações morfológicas em órgãos de abelhas expostas a agrotóxicos via exposição oral (SOARES, 2012; LAURINO *et al*., 2011; CATAE *et al*., 2014; CARNEIRO, 2018).

A presença de inseticidas nos órgãos das abelhas altera os processos naturais das células, ativando os mecanismos de desintoxicação e recuperação dos órgãos. Em último caso, quando os danos são irreversíveis, pode ocorrer a morte celular, comprometendo a recuperação e o funcionamento do órgão (NOCELLI *et al*., 2012). Diante desse contexto, uma análise profunda em nível bioquímico é de extrema importância, a fim de investigar o padrão das alterações na atividade de enzimas biomarcadoras, tanto do sistema de desintoxicação quanto as enzimas de estresse oxidativo, visto que o aumento ou a inibição na atividade dessas enzimas pode indicar uma resposta ao estressor ambiental (COGO *et al*., 2009).

Os biomarcadores são alterações biológicas ao nível molecular, celular ou fisiológico, capazes de indicar a exposição do organismo e o grau de estresse causado pelo contaminante ambiental (WALKER, 1996; CAJARAVILLE *et al*., 2000). As enzimas carboxilesterase 3 (CaEs-3) e glutationa-S-transferase (GST) são biomarcadores de exposição a xenobióticos, atuam ativamente no processo de desintoxicação de compostos químicos. As CaEs estão presentes nas primeiras vias de desintoxicação, e as enzimas GST participam da segunda via, sendo uma das mais importantes enzimas de biotransformação (BELZUNCES *et al*., 1988; DELAGE-DARCHEN *et al*., 1982; RUVOLO-TAKASUSUKI *et al*., 1997).

Em estudos de Tavares (2015), a atividade de enzimas de exposição (GST e CaEs) aumentou significativamente durante a fase larval e pupal de abelhas *A. mellifera*, devido a exposição ao neonicotinoide tiametoxam. A atividade enzimática variou de acordo com os estágios de desenvolvimento das abelhas. Outros estudos também demonstraram que a resposta enzimática em decorrência a exposição a xenobióticos pode variar (BADIOU-BÉNÉTEAU *et al*., 2012; CARVALHO *et al*., 2013). Por outro lado, nos processos oxidativos estão envolvidas as enzimas

responsáveis pelas defesas antioxidantes. Essas enzimas são responsáveis por agir por meio de mecanismos de prevenção, impedindo o desequilíbrio na produção de radicais livres (espécies reativas de oxigênio – EROs) (COGO *et al*., 2009; BARBOSA *et al*., 2010).

O estresse oxidativo é ocasionado pelo desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, culminando em um descontrole na formação de EROs. Para manter a integridade das células, a prevenção de danos oxidativos ao DNA é realizada pelas enzimas antioxidantes, que regulam e atuam ativamente para manter o equilíbrio entre as moléculas. O estudo da atividade dessas enzimas tem eficiência para indicar uma resposta celular do organismo, em decorrência do processo de estresse oxidativo. Uma vez que esse processo gera a oxidação de moléculas e a perda de suas funções biológicas, implicando em danos oxidativos às células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; WOUNG *et al*., 2000; BARBOSA *et al*., 2010)

Nesse contexto, o sistema antioxidante é constituído por enzimas como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutationa peroxidase (GPx). É mediante esse sistema que o organismo é capaz de manter as concentrações corretas de EROs dentro dos limites fisiológicos (DANDEKAR *et al*., 2002; BARBOSA *et al*., 2010; STANTON, 2012).

Balieira (2017), observou em seus estudos que o inseticida imidacloprido aumentou a atividade de enzimas antioxidantes GPx no tórax de abelhas *A. mellifera*, indicando uma ação pró-oxidante. Contudo, a maioria dos estudos são com a espécie exótica *A. mellifera*, e nada se sabe sobre a atividade de enzimas biomarcadoras em abelhas *S. postica* , expostas a clotianidina no período larval.

A *S. postica* é a espécie nativa mais adequada para ser atribuída como organismo modelo e representante das abelhas nativas em testes de toxicidade durante a fase larval (ROSA-FONTANA *et al*., 2020). Ademais, em virtude do atual questionamento sobre o uso da *A. mellifera* como organismo modelo e substituto de espécies nativas brasileiras, é de suma importância a produção de dados sobre abelhas sem ferrão, uma vez que são várias as espécies nativas que têm se mostrado mais sensíveis a substâncias do que a abelha de gênero *Apis* (PIRES *et al.,* 2016; IBAMA, 2017).

Em vista disso, estudos de efeitos subletais de abelhas expostas a esse composto via alimentação larval, são de extrema importância para entender se, e

como, esse inseticida interfere no desenvolvimento e na sobrevivência de abelhas nativas sem ferrão. Dentre os estudos, análises de alterações morfológicas e da atividade de enzimas biomarcadoras em órgãos relacionados à absorção e metabolização de substâncias (intestino e túbulos de Malpighi), tem sido amplamente empregados (SOARES *et al*., 2015; JACOB *et al*., 2014; OLIVEIRA *et al*., 2013).

Considerando a importância ecológica, econômica e a ausência de dados para os efeitos da clotianidina durante as fases de desenvolvimento de larvas, pupas e após a emergência de abelhas *S. postica*, o presente estudo é inédito por ser o primeiro a avaliar os efeitos da exposição larval a clotianidina e trazer informações essenciais no que se refere aos impactos desse inseticida sobre essa espécie de abelha sem ferrão.

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIOLI, C. J., *et al*. Polinizadores em perigo: por que nossas abelhas estão desaparecendo? In: Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso. In: Simpósio Internacional Ciência, Saúde e Território, 4., 2017, Lages, SC. Anais Alimentos seguros, nutritivos e suficientes. Lages, SC: UNIPLAC, 2017.

BLACQUIÈRE, T., *et al*. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. Ecotoxicology, 21(4), p. 973-992, 2012.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A., *et al*. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide Thiamethoxam. Ecotoxicol. Environ. Saf., New York, v. 82, p. 22–31, 2012.

BARBOSA K.B.F, COSTA N.M.B, ALFENAS R de C.G, *et al*. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev. Nutr., Campinas, 23(4):629-643, doi: 10.1159/000320546, jul./ago., 2010.

BALIEIRA, K.V.B. Efeito oxidante do imidacloprido em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e potencial ação antioxidante da cafeína. (Dissertação), Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho" faculdade De Ciências Agrárias E Tecnológicas - CAMPUS DE DRACENA, 2017.

BELZUNCES, L. P.; TOUTANT, J. P.; BOUNIAS, M. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. = Evidence formphiphilic and hydrophilic forms characterized bytriton X-114 phase separation. Biochem. J., [S. I.], v. 255, p. 463-470, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. Anal. Biochem., New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BPBES/REBIPP: Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. WOLOWSKI, M. *et al*. (Org.). 1ª edição, Campinas, SP. 184 páginas, 2019.

BYRNE, F. J., *et al*. Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. Pest Management Science, v. 70, n. 3, p. 470–482, 2014.

BUCKINGHAM, S.D., LAPIED, B., LE CORRONC, H., GROLLEAU, F., SATTELLE, D.B. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. J. Exp. Biol. 200(21), 2685- 2692, 1997.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D.; Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, 2013.

CAJARAVILLE, M. P., *et al*. The useof biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. Sci. Total Environ., Bethesda, v. 247, p. 295-311, 2000.

CARNEIRO, L. S. Efeito citotóxico do iprodione no intestino médio de operárias da abelha *Apis mellifera*. (Dissertação mestrado), 2018.

CARVALHO, S. M., *et al*. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honey bee *Apis mellifera* to insecticides. Environ. Toxicol. Chem., New York, v. 32, n. 9, p. 2117–2124, 2013.

CAESTANO, F.H.; JAFFÉ, K.; CREWE, R.W. The digestive tract ofthe Cataulacus ants: presence of the microorganismsin the ileum.12th Congress of the International Union forthe Study of Social Insects. p.391, 1994.

CRUZ-LANDIM, C. Abelhas - Morfologia e Função de Sistemas. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, p. 407, 2009.

CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. Sociobiology, Chico, v. 34, n. 3, p. 597-603, jan. 1999.

CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. Relatório PibAgro - Brasil, 2014.

CATAE, A. F., *et al*. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Microsc. Res. Tech., 77: 274-281, 2014.

COGO, A. J. D., *et al*. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. Natureza online, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

DAILY, G. C. Nature's Services: Societal Dependence on Natural Ecosystems. Washington: Island Press, 1997.

DELAGE-DARCHEN, B.; RAMOS DE CONCONI, J.; AGUILAR, C. Comparaison entrel'équipement enzymatique des glandes salivaires et l'intestin moyen de diverses espècesd'abeilles sociales. Apidologie, v.13, p.265-273, 1982.

DANDEKAR, S. P.; NADKARNI, G.D.; KULKARNI, V.S.; PUNEKAR, S. Lipid Peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. Journal of Postgraduate Medicine, v.48, n.3, p.186-190, 2002.

DIVELY, G. P.; KAMEL, A. Insecticide Residues in Pollen and Nectar of a Cucurbit Crop and Their Potential Exposure to Pollinators. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 60, n. 18, p. 4449–4456, 2012.

FRAZIER, M.; MULLIN, C.; FRAZIER, J.; ASHCRAFT, S. What have pesticides got to do with it? American Bee Journal, v.148, p. 521-523, 2008.

GOMORI, G. Human esterases. J. Lab.Clin. Med., Saint Louis, v. 42, p. 445-453, 1953.

GOULSON, D. *et al*. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science, Washington, v. 347, n. 6229, p. 1-16, 2015.

GIANNINI, T.C. *et al*. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. Journal of Economic Entomology, p.1–9. 2015.

HALLIWELL, B; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cellculture: How should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol 142:231–255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776, 2004.

HABIG, W. H., *et al*. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. Proceedings of the National Academy of Sciences, 71(10), 3879-3882, 1974.

HEITHAUS, E.R. The role of plant-pollinator interactions in determining community structure. Annual Missouri Botanical Garden, p. 61:675-691, 1974.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Acessado em maio de 2022. Disponível em <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>, 2020.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Manual de Avaliação de Risco Ambiental de Agrotóxicos para Abelhas. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/reavaliacaoambiental/2017/2017-07-25-Manual-IBAMA-ARA-Abelhas-IN0217-WEB.pdf>, 2017.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicosaosecossistemas_polinizadores_vera.pdf>, p. 10, 2004.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; JOLY, C. A. Avaliação Polinizadores, Polinização e Produção de Alimentos da Plataforma Intergovernamental de Biodiversidade e Serviços de Ecossistemas (IPBES). Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). *In:* Importância dos polinizadores na produção de alimentos e na segurança alimentar global. Brasília, DF: 124p. 2017.

IPBES. The assessment report on Pollinators, Pollination and Food production. Summary for policymakers. Co –Chairs: Simon Potts (UK), Vera L. Imperatriz-Fonseca (Brasil). MCTI/USP, 2017.

JACOB, C. R. O. *et al*. Impact Of Fipronil On The Mushroom Bodies Of The Stingless Bee Scaptotrigona Postica. Pest Management Science (Print) , 2014.

JAY, S.C. Spatial management of honeybees on crops. Annual Reviews of Entomology, 31: 49-65, 1986.

JACOB, C. R. O. *et al*. Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee Scaptotrigona postica Latreille. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 90, p. 69-72, 2013.

JUNIOR MOTTA, J.C. A dieta equilibrada do lobo Guará. Pesquisa Fapesp. 52 eds. abril. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2000/04/01/a-dieta-equilibrada-do-lobo-guara/>, 2000.

KASIOTIS, K. M.; ANAGNOSTOPOULOS C.; ANASTASIADOU, P.; MACHERA, K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. Science of the Total Environment 485–486/ 633–642, 2014.

KLEIN, A. M. *et al*. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences, v. 274, p. 303-313, 2007.

KLEIN, S., CABIROL, A., DEVAUD, J. M., BARRON, A. B., & LIHOREAU, M. Why Bees Are So Vulnerable to Environmental Stressors. Trends in Ecology and Evolution. Elsevier Ltd, 2017.

KEVAN, P.; VIANA, B.F. The global decline of pollination services. Biodiversity, p. 4:3-8, 2003.

KERR, W.E. *et al.* Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. -- Belo Horizonte, MG: Acangaú, p. 157, 1996.

KREMEN, C. Pollination services and community composition: does it depend on diversity, abundance, biomass or species traits? Pp. 115-124. In: B.M. Freitas & J.O.B. Portela (eds.). Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Imprensa Universitária – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 285p, 2004.

LAURINO, D.; PORPORATO, M.; PATETTA, A.; MANINO, A. Toxicity of Neonicotinoid Insecticides to Honey Bees: Laboratory Tests. Bulletin of Insectology, Bologna, v.64, n.8, p.107-113, 2011.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. Brazilian Journal of Morphological Sciences, São Paulo, v. 23, n. 1-3, p. 303-309, 2006.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. Eur. J. Biochem, Berlin, v. 47, p. 469-474, 1974.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. Ecosystem and Human Well-Being: a framework for assessment. Island Press, Washington, DC, 2003.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis. Island Press, Washington, DC, 2005.

MICHALSKI, L.J.; BARBOLA, I. de.F; LUZ, P.M. da. Ecologia trófica do lobo-guará, *Chrysocyon Brachyurus* (ILLIGER, 1811), no Parque Estadual do Guartelá, Tibagi, PR, Brasil. Revista Brasileira de Zoociencias 15 (1, 2, 3): 107-122. 2013.

MICHENER, C.D. Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees, New York: Springer. p.654, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). AGROFIT. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. 2022.

NAUEN, R. Thiametoxam is neonicotinoid precursor converted to clothianidinin insects and plants. Pesticide Biochemistry and Physiology, San Diego, v.76, n2, p.55-69, 2003.
NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 446p, 1997.

NOCELLI, R.C.; ROAT, T.C.; ZACARIN, E.C.S.; MALASPINA, O. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. In: Semana dos Polinizadores, 3., 2012, Petrolina. Palestras e resumos... Petrolina: Embrapa Semiárido. (Embrapa Semiárido. Documentos, 249), 2012.

NOCELLI, R.C. *et al*. Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. Open Access Insect Physiology. April 2016.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, set. 1998.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutation peroxide. J. Lab. Clin. Med., Saint Louis, v. 70, p. 158-169, 1967.

PEDRO, S.R.M. The Stingless Bee Fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). Sociobiology 61(4): p.348-354, 2014. 2014.

PERROT, T., *et al*. Experimental quantification of insect pollination on sunflower yield, reconciling plant and field scale estimates. Basic and Applied Ecology, 34, 75–84., 2019.

POHORECKA, K., *et al*. Residues of Neonicotinoid Insecticides in Bee Collected Plant Materials from Oilseed Rape Crops and their Effect on Bee Colonies. Journal of Apicultural Science, v. 56, n. 2, 2012.

RANCAN, M.; ROSSI, S.; SABATINI, A. G. Determination of Thiamethoxam residues in honeybee by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor. Journal of Chromatography, Amsterdam, v.1123, p.60-65, 2006.

ROSSI, C. A. Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de malpighi de *Apis mellifera* africanizada. (dissertação). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, câmpus de Rio Claro. 2011.

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

ROUBIK, D. W. The pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), Roma, 2018.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; DEL LAMA, M.A.; SOARES, A.E.E. Genetic characterization of a new *Apis mellifera* esterase. Apidologie, v.28, p.259-267, 1997.

SCHMUCK, R. *et al*. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. Pest Management Science, v. 57, n. 3, p. 225–238, 2001.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Gut Structures In Adult Workers Of Necrophorous Neotropical Stingless Bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Entomologia Generalis, v. 19, n. 4, p. 261-265, 1995.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. *et al*. Structure and function of the intestine and Malpighian tubules: from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. Chapter in Social Insects: Structure, Function and Behavior. Nova Science Publishers, USA, p. 27, 2010.

SILVA, C.I. *et al*. Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras do Brasil. 1ª Edição. Usp, São Paulo – SP. 2014.

SOARES, H. M. Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão Scaptotrigona postica LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI). (Dissertação), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, câmpus de Rio Claro. 2012.

SOARES, H. M. *et al*.Toxicity of Imidacloprid to the Stingless Bee Scaptotrigona postica Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 94, p. 675-680, 2015.

SNODGRASS, R.E. Anatomy and Physiology of the Honeybees. New York: Comstock Publishing Ass. p. 327, 1956.

SOROUR J. Ultrastructural variations in Lethocerus niloticum (Insecta:Hemiptera) caused by pollution in Lake Mariut, Alexandria, Egypt. Ecotoxicol. Environ. Saf. 48:268–74, 2001.

STANTON, R.C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. IUBMB Life, 64(5): 362–369, 2012.

STONER, K. A.; EITZER, B. D. Movement of Soil-Applied Imidacloprid and Thiamethoxam into Nectar and Pollen of Squash (Cucurbita pepo). PLoS ONE, v. 7, n. 6, e39114, 27 jun. 2012.

SUCHAIL, S., DEBRAUWER, L., BELZUNCES, L.P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. Pest. Manag. Sci. 60(3), 291-296. doi: 10.1002/ps.772, 2004.

THIBOLDEAUX R.L., LINDROTH R.L., TRACY J.W. Effects of juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) on midgut morphology and glutathione status in Saturniid moth larvae. Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 120(3):481–7, 1998.

TAVARES, D.A. Avaliação bioquímica e imunohistoquímica dos efeitos subletais do tiametoxam sobre *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). (Tese) Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – campus de Rio Claro, 2015.

TADEI, R. *et al*. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. Sci Rep. doi: 10.1038/s41598-019-39383-z. 1 Mar, 2019.

UCHIGASHIMA, M. *et al*. Development of Immunoassay Based on Monoclonal Antibody Reacted with the Neonicotinoid Insecticides Clothianidin and Dinotefuran. Sensors, v. 12, n. 11, p. 15858–15872, 2012.

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. Principles of Ecotoxicology. London: Taylor & Francis, 321 p., 1996.

WHITEHORN, P.R.; O’CONNOR, S.; WACKERS, F.L.; GOULSON, D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. Science, v.336, p.351-352, DOI: 10.1126/science.1215025., 2012.

WOUNG, W. Y.; THOMAS, C.M.; MERKUS, J.M.; ZIELHUIS, G.A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. Fertility and Sterility, v.73, n.3, p.435-442, 2000.

WRATTEN, S.D. *et al*. Pollinator habitat enhancement: Benefits to other ecosystem services. Agriculture, Ecosystems and Environment. v 159, p. 112-122, 2012.

6.CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

- Este estudo fornece dados essenciais para a caracterização dos riscos de exposição de abelhas nativas a clotianidina.

- A exposição larval a concentrações ambientalmente relevantes de clotianidina pode afetar a sobrevivência e o desenvolvimento de abelhas *S. postica.*

- A clotianidina apresentou maior toxicidade para as larvas, demonstrando ser o período mais crítico durante o desenvolvimento.

- Tanto a concentração recomendada no campo, quanto a concentração subletal, demonstraram alta toxicidade e, portanto, oferecem risco as populações de abelhas ao serem aplicadas para o tratamento de sementes.

- A clotianidina apresentou citotoxicidade nos órgãos de metabolização de substâncias, prejudicando as funções vitais desempenhadas por eles.

- A concentração de campo demonstrou modular significativamente a atividade das enzimas CaEs-3, GST e G6PD, sugerindo uma resposta celular em decorrência da exposição a clotianidina.