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

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DOS EFEITOS SUBLETAIS
DO TIAMETOXAM SOBRE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA, APIDAE)**

DAIANA ANTONIA TAVARES

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

**Rio Claro
Setembro - 2015**

DAIANA ANTONIA TAVARES

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DOS EFEITOS SUBLETAIS
DO TIAMETOXAM SOBRE *Apis mellifera* (HYMENOPTERA, APIDAE)

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

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Co-orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Rio Claro
Setembro – 2015

*Ao meu esposo Paulo, ao meu filho Pedro,
e aos meus pais, José e Antonia.*

AGRADECIMENTOS

A realização de um trabalho acadêmico, não é cercada simplesmente pelo conhecimento, nem tão pouco, somente por teorias e pela busca incessante das respostas aos nossos questionamentos quanto pesquisador, mas muito além dos ofícios desenvolvidos pelo cientista, estão as amizades e as relações humanas, construídas no decorrer da realização de um trabalho, e que, para esta que vos fala, foi o combustível substancial para a concretização desta etapa de minha carreira. Assim sendo:

Agradeço de forma muito especial ao meu esposo Paulo, e meu filho Pedro, pela compreensão nos períodos de ausência, pelo apoio e motivação que sempre me deram, por todo carinho, companheirismo e por toparem estar comigo nesta empreitada. O amor é o que de fato nos motiva. Vocês foram fundamentais para a finalização deste trabalho. Amo vocês.

Agradeço aos meus pais José e Antonia, que com amor, esforço e dedicação sempre fizeram o possível para meu prosseguimento nos estudos. Palavras jamais serão suficientes para expressar minha gratidão e amor. Eu amo muito vocês.

Agradeço aos meus irmãos Edson, Eliana e Daniela e minha sogra Sonia, por sempre colaborarem e tornaram possível a concretização deste trabalho, seja ajudando a cuidar do meu filho, seja nos momentos de descontração ou com palavras de motivação. Meus amados sobrinhos, me motivaram todo o tempo, através de cada sorriso, e cada momento alegre que me proporcionaram.

Agradeço a Paróquia de Santo Antonio, Barra Bonita, SP, a qual eu faço parte, na pessoa do Padre e amigo Fábio Rogério Timóteo, pois nos momentos mais difíceis dessa trajetória, a igreja foi meu porto seguro, o evangelho e oração foram meu sustento, para que jamais desistisse ou desanimasse.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo financiamento de minhas atividades no Brasil e no Exterior, sem as quais seria impossível a realização deste trabalho.

Agradeço ao Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro, por fornecer estrutura necessária para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Osmar Malaspina, sempre presente nesta trajetória, por me apoiar, me incentivar, pela confiança e atenção dispensada no decorrer deste tempo de estudos, pelos conselhos e ensinamentos, como também pela amizade, sou e serei sempre grata.

Agradeço a minha co-orientadora e amiga, Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias Silva-Zacarin, exemplo de amor à pesquisa, sempre me inspirando, com alegria e amor contagiantes. Obrigado pelo incentivo e apoio de sempre, como também pela amizade e carinho.

Agradeço ao colaborador e amigo Prof. Dr. Stephan Malfitano Carvalho, por toda ajuda prestada em minha formação, como também pela confiança depositada em meu desempenho, viabilizando a realização de meu estágio no exterior.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Ecotoxicologia de Abelhas (LECA), pelas conversas, discussões científicas, por toda ajuda no meu crescimento e amadurecimento na pesquisa e também como pessoa. De maneira especial, agradeço a MSc. Hellen Maria Soares, Adna Dorigo, Dra. Thaisa C. Roat, Dra. Roberta C.F. Nocelli, Dra. Priscila C. Socolowski, Aline Catae, Priscila Friol, Dra. Sandra Denardi, Dr. Rodrigo Avelaira Barbosa, Dr. Rafael A. Costa Ferreira, pela agradável convivência, pelas descontrações, brincadeiras e risadas.

Agradeço ao apicultor Antonio Sérgio Pascon, grande amigo e colaborador nas coletas de larvas de abelhas.

Agradeço a todos os amigos e funcionários do Centro de Estudos de Insetos Sociais, CEIS, especialmente a secretária e amiga Necis Miranda de Lima, por toda atenção e amizade.

Agradeço aos meus companheiros de moradia em Rio Claro, que foram minha família quando estava distante de casa, Rafinha, Ana, Gustavo e Tássio, pela acolhida e amizade durante este período.

Agradeço carinhosamente a toda equipe do Labotaroire de Toxicologie Enviromentale (LTE) do Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, Avignon, France, que tornou possível a realização do estágio no exterior. Especialmente ao meu orientador no exterior, Dr. Luc P. Belzunces, por todo apoio, confiança, pelos conselhos e amizade de sempre, a Dra. Claudia Dussaubat pela amizade, pelos ensinamentos na realização das técnicas enzimáticas, ao doutorando Guillaume Kairo, pela ajuda nas coletas, como também pela amizade e conselhos científicos, a Marianne Cousin, pelos conselhos científicos, como também pela amizade, ao Dr. Yannick Pocket, Dr. Jean-Luc Brunet e Sylvie Tchamitchian pela acolhida e amizade, e a André Kretzschmar pela amizade e ajuda na realização das análises estatísticas.

Agradeço de maneira muito especial aos meus amigos de Avignon, Fábio Oséias, Marlice Bonini, Viviane Pardini, Marta Aventurier, Pascal Aventurier, Dayaeth Alfonzo,

Pablo Luiz Araújo Munhoz, Pedro Henrique Gonzáles Silva, Wladimir Araújo Tavares, Marilena Moura Nobre e Joseana Severo. Obrigado por fazerem deste período no exterior uma fase muito especial, pelos passeios, risadas, conselhos, enfim, foi uma incrível jornada! Agradeço especialmente ao amigo e Padre Cesario Escarda pela amizade, carinho e preocupação com minha família durante nossa estadia em Avignon.

Finalmente, agradeço a Deus, que para aqueles que creem, é o autor e possibilitador de todas as coisas.

Porque sem mim, nada podeis fazer (João, 15, 5)

RESUMO

As abelhas *Apis mellifera* possuem importância econômica e ecológica, pois são polinizadoras de culturas agrícolas e áreas naturais, além do fato de que os produtos e subprodutos da colônia serem comercializados. Nas últimas décadas, houve um aumento na produção agrícola mundial e consequentemente, uma intensificação da utilização dos inseticidas, usados para combater insetos-praga. Dentre os inseticidas, destacam-se os neonicotinoides, amplamente utilizados, pela sua eficiente, ação sistêmica nas plantas. O tiametoxam que pertence a esta classe de inseticida, atua como agonista nos receptores nicotínicos de acetilcolina no sistema nervoso central dos insetos. No entanto, o tiametoxam pode afetar também insetos não alvos, como as abelhas. Uma vez que as abelhas forrageiras podem coletar pólen e néctar contaminados, e estocar no interior da colônia, tanto as abelhas adultas como larvas, que dependem dos recursos alimentares fornecidos pelas operárias, podem também ser contaminadas. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a toxicidade do tiametoxam durante o desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera*, em decorrência da exposição larval a este inseticida, e analisar os efeitos subletais deste inseticida em estágios pós-embrionários, na sobrevivência, na atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), carboxilesterase (CaEs) e fosfatase alcalina (PAL), como também, avaliar os níveis da proteína sinapsina no cérebro. Foram feitos bioensaios de exposição larval aguda ao tiametoxam, por contato, ou ingestão. Após 48h da exposição tópica ao tiametoxam, verificou-se um aumento na mortalidade a partir da dose de 15 ng/μL, além de efeitos sobre a pupação e emergência das abelhas, especialmente na dose de 500 ng/μL. Foram observadas, alterações na sobrevivência de larvas, expostas oralmente a dose subletal de 1,44 ng/μL, e nas pupas previamente expostas a 1,44 e a 0,001 ng/μL, com consequente redução na porcentagem de abelhas emergentes. Foram observados efeitos subletais por meio do aumento da atividade enzimática da AChE nas larvas expostas a concentração de 1,44 e em pupas e recém-emergidas nas concentrações de 1,44; 0,001 e 0,00001 ng/μL. A atividade enzimática das enzimas de desintoxicação GST e CaEs, foram maiores nas pupas, para todas as concentrações testadas. Não foram observadas diferenças significativas para a enzima PAL. Finalmente, as quantificações das marcações imunocitoquímicas da proteína sinapsina, após exposição subletal ao tiametoxam, revelaram uma diminuição dos níveis desta proteína nos corpos pedunculados de pupas dos grupos expostos a 1,44 ng/μL e 0,001 ng/μL e de operárias recém-emergidas do grupo exposto a 1,44 ng/μL, diminuições na imunomarcagem da

sinapsina. Foram observadas nos lobos antenais de pupas e recém-emergidas do grupo exposto a 1,44 ng/ μ L. Assim, baseados em nossos dados, verificamos que a exposição larval ao inseticida tiametoxam reflete negativamente na sobrevivência e fisiologia de larvas, pupas e operárias recém-emergidas de *A. mellifera*. As alterações aqui observadas podem comprometer as atividades fisiológicas e consequentemente a sobrevivência das abelhas adultas, como também, no caso das alterações da sinapsina, comprometer as funções de comunicação, navegação e busca por recursos florais.

Palavras chave: Cérebro. Neonicotinoide. Desenvolvimento. Abelhas. Inseticida.

ABSTRACT

The honeybee *Apis mellifera* have the economic and ecological importance, because they are pollinators of agricultural crops and natural areas, apart from the fact that the products and by-products of the colony are marketed. In recent decades, there has been an increase in global agricultural production and consequently a greater use of insecticide used to combat insect pests. Among the insecticides, the neonicotinoids stand out, widely used by its efficient, systemic action in plants. The thiamethoxam insecticides that belongs to this class acts as an agonist at nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system of insects. However, thiamethoxam can also affect non-target insects such as bees. Once the forage bees can collect contaminated pollen and nectar, and store inside the colony, both adult bees and larvae, which depend on food resources provided by workers, may also be contaminated. The objectives of this study were to evaluate the toxicity of thiamethoxam in the post-embryonic development of *A. mellifera*, as a result of larval exposure to this pesticide, and analyze the sublethal effects of this insecticide in post-embryonic stages, the survival, the enzymatic activity acetylcholinesterase (AChE), glutathione-S-transferase (GST), carboxylesterase (CaEs) and alkaline phosphatase (PAL), as well as to evaluate the levels of the protein synapsin in the brain. Bioassays were made acute larval exposure thiamethoxam, by contact or ingestion. After 48 hours of exposure topical to thiamethoxam, there was an increase in mortality in a dose of 15 ng/ μ L and also effects on pupation and emergence of bees, especially at a dose of 500 ng/ μ L. Were observed changes in the survival of larvae exposed orally to sublethal dose of 1.44 ng/ μ L, and pupae in the pre-exposed to 1.44 and 0.001 ng/uL, with consequent reduction in the percentage emerging honeybees. Sublethal effects were observed by increasing the enzyme activity of AChE in the larvae exposed to concentrations of 1.44 and pupae and newly emerged at concentrations of 1.44, 0.001 and 0.00001 ng/ μ L. The enzymatic activity of detoxification enzymes GST and CaEs, were increased in the pupae, for all concentrations tested. No significant differences were observed for the PAL enzyme. Finally, measurements of protein synapsin immunocytochemistry markings after sublethal exposure to thiamethoxam, revealed a decrease in levels of this protein in mushroom bodies of pupae of the groups exposed to 1.44 ng/uL and 0.001 ng/uL and newly emerged workers the group exposed to 1.44 ng/uL. Decreases in immunostaining of synapsin were also observed in the antennal lobes of pupae and newly emerged the group exposed to 1.44 ng/uL. Thus, based on our data, we found that larval exposure to insecticide thiamethoxam reflects negatively on

survival and physiology of larvae, pupae and newly emerged workers of *A. mellifera*. The changes observed here may affect the physiological activities and consequently the survival of adult bees, as well as in the case of changes of synapsin compromise the functions of communication, navigation and search by floral resources.

Keywords: Brain. Neonicotinoid. Development. Bees. Insecticide.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 OBJETIVOS GERAIS.....	19
3 CAPÍTULO 1: TOXICIDADE DO TIAMETOXAM PARA LARVAS, PUPAS E RECÉM-EMERGIDAS DE ABELHAS AFRICANIZADAS <i>Apis mellifera</i>.....	20
3.1 INTRODUÇÃO	22
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.4 RESULTADOS.....	26
3.5. DISCUSSÃO.....	31
4 CAPÍTULO 2: EFEITOS SUBLETAIS SOBRE OS ESTÁGIOS PÓS-EMBRIONÁRIOS DE <i>Apis Mellifera</i> A PARTIR DA EXPOSIÇÃO LARVAL AO TIAMETOXAM.....	37
4.1 INTRODUÇÃO	39
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.3. RESULTADOS.....	45
4.4 DISCUSSÃO.....	51
5 CAPÍTULO 3: PUPAS E RECÉM-EMERGIDAS DE <i>Apis mellifera</i> AFRICANIZADA TEM OS NÍVEIS DE SINAPSINA ALTERADOS APÓS A EXPOSIÇÃO SUBLETAL AO TIAMETOXAM NA FASE LARVAL	59
5.1 INTRODUÇÃO	61
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	63
5.3 RESULTADOS.....	67
3.4 DISCUSSÃO.....	72
6 DISCUSSÃO GERAL.....	78
7 CONCLUSÕES GERAIS	80
REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *A. mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), é a mais conhecida entre as abelhas. No Brasil, grande parte desta espécie é resultante do cruzamento entre a subespécie europeia, *A. mellifera mellifera* L., 1758 com a subespécie africana, *A. mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 dando origem aos híbridos *A. mellifera* africanizada (KERR et al., 1970; MALASPINA; STORT, 1987).

As abelhas melíferas são insetos que possuem grande valor ecológico e econômico, pelo fato de contribuírem substancialmente com a polinização de uma grande porcentagem de espécies vegetais, além de sintetizarem produtos como mel, cera, própolis e geleia real. Neste sentido, pesquisas que visem identificar e avaliar possíveis riscos a insetos benéficos, em todas as fases do seu desenvolvimento, são especialmente relevantes (DEVILLERS, 2002).

A polinização é essencial para a manutenção da diversidade das plantas nativas, mas também beneficiam as plantas cultivadas, uma vez que mesmo quando não dependem exclusivamente deste processo para sua reprodução, aumentam a quantidade e a qualidade das colheitas quando são polinizadas. Estima-se que aproximadamente 75% das culturas agrícolas importantes mundialmente, tem sua produção melhorada com a presença de polinizadores. (DEVILLERS, 2002; FAO, 2004; GALLAI et al., 2009; KLEIN, et al., 2007; KREMEN, et al., 2007).

As abelhas melíferas são eficientes polinizadores de culturas agrícolas. Na cultura de soja, por exemplo, elas aumentam a produtividade em até 61,38% quando as plantas são polinizadas (CHIARI et al., 2005). Um estudo realizado com a cultura de laranja demonstrou que *A. mellifera* foi responsável não somente pelo aumento qualitativo como também pelo aumento quantitativo da produção (MALERBO-SOUZA; NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2003). Se tratando da cultura de girassol, após a realização de um estudo para investigar quais eram as abelhas responsáveis pela polinização desta cultura, concluiu-se que *A. mellifera* apresentou o maior índice de visitação nas flores entre as abelhas visitantes desta planta, o que demonstra sua significativa participação nas atividades de polinização do girassol (RAMOS; VIEIRA, 2011).

Quando se reporta aos indicadores econômicos, apenas nos Estados Unidos estima-se que a polinização realizada por *A. mellifera*, gere em torno de US\$ 15 bilhões de dólares anuais (MORSE; CALDERONE, 2000). No Canadá, em levantamentos realizados por Kevan e Phillips (2001) a atividade de polinização de *A. mellifera* gera cerca de US\$ 6 milhões por ano com a produção de sementes da alfafa. Segundo Gallai et al. (2009), o valor do serviço de polinização das abelhas, em escalas mundiais, gira em torno de €153 bilhões, sendo que

destes, as espécies frutíferas representam €50 bilhões. Em relação ao Brasil, de 141 culturas, 85 dependem dos polinizadores, e os serviços de polinização gera um mercado de aproximadamente US\$45 bilhões anuais (GIANNINI et al., 2015).

Durante os anos de 2006 e 2007, foi relatado nos EUA um fenômeno denominado CCD (*Colony Collapse Disorder*), quando vários apicultores apontaram perdas de até 80% das colônias (STOKSTAD, 2007). Também há relatos de perda de colônias na Europa, onde segundo dados da FAO (2009), houve uma diminuição de 21 milhões (1970) para 15,5 milhões (2007) (ELLIS, 2010; NEUMANN, 2010). Entre as possíveis causas desta redução estão doenças causadas por parasitas, bactérias, fungos e vírus, a fragmentação dos habitats naturais e também a possível intoxicação das abelhas por inseticidas, que vem sendo apontada como um dos principais responsáveis (BROMENSSHENK et al., 2010; GOULSON et al., 2015; vanENGELSDORP e MEIXNER, 2009).

No Brasil, nas regiões Sudeste e Centro-oeste, há relatos de casos de contaminação das abelhas por inseticidas aplicados em pulverização aérea. Foram encontrados em amostras de abelhas analisadas da região de Boa Esperança do Sul, a presença de resíduos do inseticida tiametoxam, possível causador da morte de cerca de 400 colônias de uma apiário desta cidade (MALASPINA et al., 2008).

Somente no Brasil, durante o período de 1964 a 2004, o consumo de defensivos agrícolas aumentou drasticamente, 700% (SPADOTTO, et al., 2004; OLIVEIRA-SILVA, 2004). Segundo os relatórios do Ibama, (2013) foram comercializados um total de 56. 993,88 toneladas de inseticidas, mostrando um aumento de 53% em relação as vendas do ano de 2012.

As abelhas podem estar em contato com os inseticidas durante a pulverização no período de florada, quando realizam o forrageamento, ou através da coleta de pólen e néctar contaminados, que neste caso, podem ser armazenados no interior da colônia e posteriormente oferecidos às larvas (BABENDREIER et al., 2004; ROTAIS, et al., 2005). Os inseticidas podem induzir dois tipos de efeitos em abelhas: os letais e os subletais, que podem comprometer em longo prazo a viabilidade, a sobrevivência e a população da colmeia (DEVILLERS, 2002; DESNEUX et al., 2007).

Entre as classes de inseticidas mais utilizados na agricultura mundial, estão os neonicotinóides. Estes inseticidas são sistêmicos, e atuam nos insetos competindo diretamente pelos receptores de nicotina e acetilcolina presentes no cérebro dos insetos, especialmente nas regiões de neurópila, ocasionando excitação, paralisia e consequentemente a morte (MAIENFISCH et al., 2001; TOMIZAWA; CASIDA, 2003). Esta classe de inseticidas tem

sete representantes, dos quais podemos destacar o imidacloprido, que foi o primeiro a ser comercializado pela Bayer CropScience no ano de 1991, e o tiametoxam, que começou a ser comercializado a partir de 1998.

O tiametoxam (3-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-5-methyl-1,3,5-oxadiazinan-4-ylidene (nitro)amine) é um neonicotinóide fabricado e comercializado pela Syngenta Proteção de Cultivos LTDA, podendo ser encontrado com os nomes de Actara[®], Adante[®], Eforia[®], Engeo[®], Cruiser[®], Alike[®], Verdadero[®], Platinum Neo[®]. No Brasil, este produto é amplamente utilizado em culturas como: citros, café, cana-de-açúcar, arroz e abacaxi, (ANDREI, 2009; NAUEN; BRETSCHNEIDER, 2002).

Diversos estudos demonstram que o tiametoxam é tóxico para as abelhas. Iwasa, et al. (2004) estudaram a ação de sete inseticidas neonicotinóides em *A. mellifera* européia, em condições laboratoriais, e verificaram que o mais tóxico foi o imidacloprido, cuja DL₅₀ foi de 17,9 ng/abelha, seguido pelo tiametoxam, que apresentou a DL₅₀ de 29,9 ng/abelha. Em estudo mais recente, Carvalho et al. (2009) verificaram que independente do modo de exposição (pulverização, ingestão ou resíduo) a concentração de 37,5 i.a./100L H₂O é tóxica para abelhas africanizadas, necessitando de em média 3,5h para provocar a morte de 50% das abelhas expostas.

Dados de avaliações da toxicidade do tiametoxam para larvas de *A. mellifera*, são menos frequentes na literatura. Recentemente, Tavares et al. (2015), expondo larvas a este produto em condições laboratoriais, verificaram que a CL₅₀ foi na ordem de 14,34 ng/μL de dieta. Em estudos de campo realizados por Wu et al. (2011), foram detectados diversos resíduos de inseticidas no interior das colônias submetidas à análise, dentre eles o tiametoxam. Os autores verificaram que houve um atraso no desenvolvimento das larvas das colônias contaminadas, quando comparadas com o grupo controle. Além da avaliação dos efeitos letais dos inseticidas, Desneux et al. (2007) ressaltam a importância da realização de trabalhos que tenham como objetivo avaliar também os efeitos subletais desses agrotóxicos.

Tavares et al. (2015) avaliaram os efeitos do inseticida tiametoxam no cérebro de larvas de *A. mellifera* africanizadas, concluindo em seus estudos que, após a exposição às doses subletais, ocorreram mortes celulares atemporais no cérebro. Esses dados indicam a possibilidade de alteração da remodelação da metamorfose cerebral, o que pode futuramente inviabilizar a sobrevivência das abelhas, ou até mesmo ocasionar a morte do indivíduo, uma vez que as funções cerebrais são extremamente importantes para a manutenção de atividades tais como a de forrageamento.

No âmbito ecotoxicológico, estudos têm demonstrado que os padrões das respostas enzimáticas em *A. mellifera* podem ser alterados, quando as mesmas são expostas a diversos tipos de xenobióticos, entre eles os inseticidas (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; NIELSEN et al., 2000). Algumas enzimas tais como acetilcolinesterase (AChE), glutationa-S-transferase (GST), carboxilesterases (CaEs) e fosfatase alcalina (PAL), estão envolvidas nos processos fisiológicos e no caso da GST e CaES, diretamente com a desintoxicação metabólica. (CLAUDIANOS et al., 2006; OAKESHOTT et al., 2005; RANSON et al., 2005).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) ocorre predominantemente no cérebro, e tem a função de hidrolisar a acetilcolina nas sinapses colinérgicas, mediando assim a transmissão neural. Pelo fato do tiametoxam ligarem-se irreversivelmente nos receptores nicotínicos de acetilcolina, possivelmente os níveis da atividade enzimática da AChE poderão ser alterados frente a exposição (BADIOU et al., 2008).

CaEs são enzimas que juntamente com enzimas P450 participam das primeiras vias no processo de desintoxicação dos insetos além de executarem funções tais como a degradação do hormônio juvenil durante a fase larval, sendo este hormônio responsável pelo início da pupação (BELZUNCES et al., 1988; DELAGE-DARCHEN et al., 1982; RUVOLO-TAKASUSUKI et al., 1997). As enzimas GST, participam da segunda fase do processo de desintoxicação metabólica, essas enzimas contribuem com a desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos, através da conjugação com uma variedade de componentes hidrofílicos, dentre eles, GSH (glutationa) (KETTERMAN, et al., 2011). Finalmente, as enzimas PAL, são enzimas digestivas que através da hidrólise do grupo fosfato, atuam em mecanismos de transporte e absorção (MOSS, 1992). Em relação às enzimas de desintoxicação, é importante ressaltar que *A. mellifera* possui um déficit de genes quando comparadas com *Drosophila melanogaster* (CLAUDIANOS et al., 2006).

Baseado no fato de que o cérebro das abelhas é alvo da ação dos inseticidas, efeitos nesta estrutura podem ocasionar prejuízos. O cérebro das abelhas é uma estrutura bem organizada, sendo a sede da integração das informações. Ele está dividido em três regiões distintas, sendo elas o protocérebro, deuterocebre e tritocérebro. O protocérebro constitui a maior parte da massa cerebral, inclui os lobos ópticos, um par latero-dorsal de corpos pedunculados, a ponte cerebral e o corpo central. No deuterocebre, estão localizados os centros olfatórios antenais e também os corpos celulares dos nervos motores dos músculos das antenas. Nas antenas, localizam-se os principais órgãos sensoriais olfatórios, os quais são

de essencial importância nas interações sociais. E por último, o tritocérebro que é reduzido nos insetos (CHAPMAN 1998; SNODGRASS, 1956).

Os corpos pedunculados são conhecidos como centro de aprendizagem e memorização dos insetos, sendo a região responsável por guiar o comportamento do adulto, pela estimulação sensorial através de informações trazidas das antenas e dos olhos. Essas estruturas são bastante volumosas, onde ocorrem sinapses nervosas (DALY; DOYEN; PURCELL, 1998).

Os lobos ópticos são extensões laterais do protocérebro, cada um, no inseto adulto, consiste de camadas internas conhecidas como lâmina, medula e lóbulo. Essas regiões são de grande importância, pois nelas existem receptores específicos para os estímulos enviados pelos fotorreceptores da camada externa, a retina. A lâmina, a medula e a lóbula estão intercaladas com regiões de neurópilas, que nada mais são do que concentrações de grande quantidade de prolongamentos nervosos. As regiões de neurópila são denominadas de quiasma interno e quiasma externo. Estas estruturas são importantes, já que estão relacionadas com o mapa neural da visão (CHAPMAN, 1998; CRUZ-LANDIM et al., 1979 ROAT; CRUZ-LANDIM, 2010).

Já os lobos antenais são basicamente formados por neurópila, que contém os prolongamentos das células sensoriais contidas na antena e os prolongamentos dos neurônios motores que, por sua vez, estão organizados no próprio lobo. Essas estruturas são de suma importância, já que recebem estímulos provenientes das antenas (CRUZ-LANDIM, 2009).

Em condições fisiológicas normais, neurotransmissores presentes no cérebro, em especial a acetilcolina, ligam-se aos seus respectivos receptores, participando ativamente das sinapses químicas (CHAPMAN, 1998). Os neonicotinoides, como é o caso do tiametoxam, ligam-se aos receptores da acetilcolina, podendo afetar os padrões sinápticos. No entanto, estudos que demonstrem essas possíveis alterações frente à exposição a inseticidas, são escassos na literatura. Um estudo realizado por Hourcade, et al. (2010) demonstrou que após submeterem abelhas *A. mellifera* a testes comportamentais de aprendizagem olfatória, houve um aumento na densidade dos microglomérulos presentes nos corpos pedunculados que participam nas sinapses nervosas.

Durante as sinapses nervosas há a presença de sinapsinas, que nada mais são do que proteínas que se ligam nas membranas pós e pré-sinápticas. O anticorpo monoclonal contra a sinapsina SYNORF1, (KLAGGES et al., 1996) pode ser utilizado em estudos com padrões sinápticos em abelhas e outros invertebrados (BRANDT, et al., 2005; GROH et al., 2004;

HOURLCADE et al., 2010) , mostrando-se como uma excelente ferramenta para este tipo de avaliação.

Diante da importância de *A. mellifera* no contexto ecológico e econômico, da escassez de dados referentes aos efeitos do tiametoxam nas fases pós-embrionárias e visando contribuir para proteção desta espécie, fica clara a importância da investigação dos possíveis efeitos que podem ocorrer nas fases pós-embrionárias, decorrentes de uma exposição de *A. mellifera* ao tiametoxam no estágio larval.

2 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar os possíveis efeitos da exposição larval ao tiametoxam sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Apis mellifera*;
- Avaliar os efeitos de concentrações subletais do tiametoxam sobre a sobrevivência de larvas e pupas e na atividade enzimática de AChE, GST, CaEs e PAL;
- Avaliar os efeitos de concentrações subletais do tiametoxam nos níveis da proteína sinapsina nos corpos pedunculados, lobos antenais e lobos ópticos do cérebro de pupas e operárias recém-emergidas;

3 CAPÍTULO 1: TOXICIDADE DO TIAMETOXAM PARA LARVAS, PUPAS E RECÉM-EMERGIDAS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA.

Daiana Antonia Tavares¹, Hellen Maria Soares¹, Elaine Cristina Matias Silva-Zacarin², Osmar Malaspina¹

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de abelhas (LECA) – Centro de estudos de insetos sociais (CEIS) – Departamento de biologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”(UNESP), Rio Claro, São Paulo.

² Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) – Departamento de Biologia – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, São Paulo.

RESUMO

Resíduos de tiametoxam encontrados no pólen e néctar das plantas são tóxicos não somente para operárias adultas de *Apis mellifera*, mas também para as larvas, expostas a este inseticida durante a sua fase de alimentação, seja por ingestão ou por contato. Pelo fato de *A. mellifera* serem insetos eficientes na polinização de plantas, como também apresentarem grande importância no contexto econômico, este estudo teve como objetivo, investigar os efeitos do tiametoxam sobre o desenvolvimento de larvas, pupas e operárias recém-emergidas de *A. mellifera*. Foram realizados bioensaios laboratoriais de exposição, para observar os efeitos dose-resposta deste inseticida, para isto, foi feita a exposição tópica das larvas no 4º dia do desenvolvimento, com seis diferentes doses que variaram de 0,5 ng/μL a 500 ng/μL. Após a exposição, foram acompanhadas a mortalidade larval, a presença de anomalias nas pupas, e a taxa de emergência das abelhas. Foram observadas diferenças nas mortalidades entre grupos expostos e o grupo controle a partir da dose de 15 ng/μL, sobre tudo, nas doses mais elevadas de 150 e 500 ng/μL. Além disso, efeitos tardios foram observados pela porcentagem de anomalias presentes nas pupas como também na porcentagem das abelhas emergentes, com diferenças significativas no grupo exposto a 500 ng/μL no primeiro caso, e nos grupos expostos a 150 e 500 ng/μL no segundo caso. Os nossos resultados demonstram que, embora as larvas apresentem maior tolerância ao tiametoxam durante a fase larval, a exposição durante esta fase, reflete diretamente nas fases posteriores do desenvolvimento. Esses dados podem ser utilizados para novos tipos de avaliações, como também servir de referências para discussões nas questões de regulamentação dos inseticidas, refletindo na consequente proteção desta espécie.

Palavras-chave: Efeitos subletais. Desenvolvimento. Neonicotinoides. Abelhas.

3.1 INTRODUÇÃO

Dentre os insetos polinizadores, as abelhas são os maiores contribuintes para a polinização de plantas e consequente manutenção dos sistemas naturais. Além disso, algumas espécies de abelhas como é o caso de *Apis mellifera*, são importantes para a polinização dos sistemas agrícolas, além de possuírem valor econômico, pelo fato de sintetizarem produtos como mel, cera, própolis e geléia real (DEVILLERS, 2002).

De um total de 115 das maiores produções de alimentos do mundo, 52 dependem do processo de polinização para a produção de frutas e sementes (KLEIN et al., 2007). Estima-se que 73% dos alimentos utilizados pelo homem para o consumo humano direto, sejam beneficiados pela polinização de abelhas (DEVILLERS, 2002; FAO, 2004; GALLAI et al., 2009; KREMEN, et al., 2007).

As estimativas indicam que *A. mellifera* africanizada, é responsável pela polinização de aproximadamente 40 mil espécies de plantas. No Brasil, esta espécie é muito importante, uma vez que ela poliniza diversos tipos de culturas, como citros, café, tomate, soja e girassol, e, e também diversas plantas naturais, uma vez que são generalistas em relação às visitas florais (CHIARI et al., 2005; GALLAI et al., 2009; INÁCIO et al., 2003; MORETI et al., 1996).

Nos anos de 2006 e 2007, foi identificado pelos apicultores norte-americanos um fenômeno de desaparecimento em massa das abelhas, que mais tarde ficou mundialmente conhecido como CCD, (*Colony Collapse Disorder*). Os apicultores chegaram a relatar perdas de 80% das colônias de *A. mellifera*. No continente Europeu, também há relatos de desaparecimento de abelhas, onde segundo dados da FAO, (2011), diminuíram de 21 milhões (1970) para 15,5 milhões (2007) (ELLIS, 2010; NEUMANN, 2010). Atualmente, as pesquisas apontam como causas da CCD, o resultado de vários fatores inter-relacionados, tais como doenças causadas por parasitas, bactérias, fungos e vírus, poluentes atmosféricos, fragmentação do habitat natural com redução de diversidade de pólen como também a exposição das abelhas aos inseticidas. (BROMENSSHENK et al., 2010; GILL et al., 2012; GIRLING et al., 2013; PETTIS et al., 2013; van ENGELSDORP e MEIXNER, 2009; van ENGELSDORP et al., 2010; WHITEHORN, et al., 2012).

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. Posteriormente, as larvas poderão se contaminar através com o alimento larval que será elaborado com os ingredientes que foram estocados no interior da colônia. (BABENDREIER et al., 2004; ROTAIS, et al., 2005).

Dentre os grupos de inseticidas, estão os neonicotinoides, inseticidas sistêmicos utilizados para o controle de insetos-praga, como afídeos, insetos sugadores, entre outros. Estes inseticidas atuam seletivamente competindo pelos receptores nicotínicos de acetilcolina presentes no sistema nervoso dos insetos, ocasionando excitação, paralisia e morte (MAIENFISCH et al., 2001; TOMIZAWA e CASIDA, 2003).

O tiametoxam, um inseticida do grupo dos neonicotinoides, é fabricado e comercializado pela Syngenta Proteção de Cultivos LTDA, podendo ser encontrado com os nomes de Actara[®], Adante[®], Eforia[®], Engéo[®], Cruiser[®], Alike[®], Verdadero[®], e Platinum Neo[®]. Sua aplicação pode ser realizada por via terrestre e aérea, de acordo com a legislação de cada país. O tiametoxam, é amplamente utilizado em culturas como: citros, café, cana-de-açúcar, arroz e abacaxi, (ANDREI, 2009; NAUEN; BRETSCHNEIDER, 2002).

Embora existam diferentes estudos na literatura sobre os efeitos dos neonicotinoides sobre as abelhas, estudos realizados durante as fases pós-embrionárias, são escassos (BLACQUIÈRE et al., 2012). Recentemente, a CL₅₀ do tiametoxam foi determinada por Tavares et al. (2015), sendo ela na ordem de 14,34 ng/μL de dieta. Esses autores relatam, que embora não cause mortalidade, concentrações subletais do tiametoxam podem causar danos no cérebro durante o desenvolvimento das larvas, podendo refletir nas atividades que serão realizadas pelos indivíduos adultos, ou até mesmo inviabilizar a sobrevivência das abelhas contaminadas.

Recentemente, foram publicadas as diretrizes para a realização de testes laboratoriais com larvas de *A. mellifera* pela Organização para Economia Cooperação e Desenvolvimento OECD, (2013), até então, havia somente publicações de protocolos para testes com adultos (OECD 1998). Essas diretrizes foram baseadas principalmente nos trabalhos desenvolvidos Aupinel et al. (2005), (2007), podendo ser adotado para a padronização de experimentos com *A. mellifera* durante a fase larval.

Assim, baseados na escassez de dados referentes à toxicidade do tiametoxam para larvas de abelhas africanizadas *A. mellifera*, são de extrema relevância os estudos que investiguem os possíveis efeitos deste xenobiótico para as abelhas, uma vez que podem fornecer informações substanciais para colaborar com a proteção das populações desta espécie, e consequente manutenção nos serviços de polinização, além de contribuir com as questões de regulamentação e comercialização de inseticidas. Desta forma, este trabalho teve como objetivo, avaliar os efeitos da exposição aguda de larvas ao inseticida tiametoxam sobre larvas, pupas e operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção das Larvas

Para a realização dos experimentos, foram selecionadas três colônias saudáveis, pertencentes ao apiário do Departamento de Biologia da UNESP - Campus Rio Claro. Os procedimentos experimentais utilizados foram realizados de acordo com metodologia proposta por Aupinel et al. (2005); (2007), adotada pela OECD (2013) com adaptações. Um quadro com células limpas foi adicionado no interior de cada colônia, para que a rainha pudesse realizar a oviposição e assim obter quantidade suficiente de larvas de 1º instar. Após o desenvolvimento embrionário, as larvas de 1º instar com até 24 horas de idade, foram transferidas para cúpulas de poliestireno contendo alimento previamente preparado, sendo as cúpulas dispostas em placas de cultura celular de 48 poços, e mantidas dentro de uma caixa de poliestireno fechada a $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $90 \pm 5\%$.

3.2.2 Preparo da dieta larval

A dieta larval foi composta pelos açúcares D-glucose, D-frutose extrato de levedura e geleia real, sendo que as concentrações variaram conforme exigências do inseto em suas diversas fases de desenvolvimento conforme descrito na Tabela 1. Todos os alimentos foram preparados em solução aquosa autoclavada e, posteriormente, filtrados usando filtro Millipore®. As larvas foram alimentadas com o auxílio de uma micropipeta, sendo a frequência, quantidade e tipo do alimento conforme descrito na Tabela 2.

3.2.3 Ensaio de toxicidade aguda

Para os bioensaios de toxicidade aguda, foram utilizadas microplacas de cultivo celular de 48 poços, sendo que em cada poço foi colocado $\frac{1}{4}$ do comprimento de algodão dental esterilizado, em seguida embebido com 500 μL de uma solução aquosa contendo 15% de glicerol e 0,2% de dicloroisocianurato de sódio. As cúpulas foram previamente esterilizadas durante 30 minutos com a mesma solução, e após estarem secas, foram expostas à luz U.V. durante 30 minutos. Após este procedimento, as cúpulas foram acondicionadas nos poços das microplacas, e posteriormente foi distribuída a dieta artificial no interior das cúpulas. Após isso, as microplacas foram acondicionadas dentro de uma caixa plástica com travas laterais, contendo béqueres com solução de K_2SO_4 com o objetivo de manter a umidade no interior da caixa. Para evitar o choque térmico antes da transferência das larvas, as caixas contendo microplacas foram alocadas dentro da B.O.D. a temperatura de $34 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade

relativa de 90 ± 5 %. Para a manutenção da umidade dentro da B.O.D. foi colocada uma bandeja contendo a mesma solução do interior da caixa plástica.

As larvas foram alimentadas do primeiro (d-1) ao quinto dia d-5. No d-4 do experimento, as larvas foram expostas a diferentes doses do inseticida tiametoxam. Foi preparada uma solução estoque de 2000 ng a.i./ μ L de tiametoxam (PESTANAL®, 99,6% de pureza, Sigma-Aldrich, Brasil) em acetona, a partir da qual, foi feita uma cascata de diluição utilizando como solvente a acetona. Com o auxílio de um aplicador automático, cada larva recebeu em seu dorso 0,5 μ L de solução, de modo que obtivemos as doses de trabalho de 0,5; 5; 15; 50; 150 e 500 ng i.a./ μ L de solução. Além do grupo controle, que não foi contaminado, foi feito um grupo controle acetona, o qual recebeu 0,5 μ L de acetona não contaminada, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos da acetona sobre os insetos. Para cada dose, bem como para os grupos controles, foram realizadas 2 repetições experimentais, sendo cada repetição composta de 16 larvas por concentração, realizada em triplicata, com n amostral = 96. Após a exposição aguda, as mortalidades larvais foram contabilizadas após 24h e 48h.

3.4 Taxa de pupação, porcentagem de anomalias e emergência

Para a pupação das abelhas, no d-7 foram retiradas as soluções de K_2SO_4 do interior das caixas e da B.O.D, e as mesmas foram substituídas por recipientes com uma solução saturada de NaCl, diminuindo a umidade de modo que esta ficasse em torno de 80%. Os algodões dentais das placas de cultura celular foram removidos com a mesma finalidade. Para a emergência, no d-15, as cúpulas correspondentes aos seus respectivos grupos de exposição como também o grupo controle e controle do solvente, foram acondicionadas em potes plásticos previamente furados, contendo em seu interior água + açúcar e mel na proporção de 50% cada. Durante a fase pupal, as pupas eram visualmente identificadas, contabilizadas, e eram registradas possíveis anomalias, como por exemplo, não saída dos apêndices, olho composto com tamanho avantajado, cabeça de pupa e corpo de larva. Em relação a emergências, as cúpulas eram inspecionadas diariamente, e eram consideradas emergentes, as abelhas que saíam das cúpulas com características semelhantes as dos indivíduos recém-emergidos da colônia. As análises da mortalidade, como também dos outros parâmetros, foram feitas através do programa SigmaPlot 11.0, (Systat), utilizando o teste do qui-quadrado. Foram denotadas diferenças significativas ao nível de $p < 0,005$.

3.4 RESULTADOS

Durante a realização dos bioensaios, foi possível acompanhar a progressão do desenvolvimento larval de *A. mellifera* africanizada em condições laboratoriais, conforme nos mostra a Figura 1. Na sequência, após 48h da aplicação tópica do inseticida tiametoxam, pôde-se constatar, diferenças na mortalidade dos grupos expostos a 15 ng/μL, 50 ng/μL, 150 ng/μL e 500 ng/μL, quando comparados com o grupo controle (Qui-quadrado $p < 0,05$; Figura 2). As doses de 0,5 ng/μL e 5 ng/μL (Figura 2) não apresentaram diferenças quanto a taxa de mortalidade. Diferentemente dos testes convencionais de toxicidade, pode-se observar que mesmo a dose mais elevada de tiametoxam não causou 50% de mortalidade das larvas expostas.

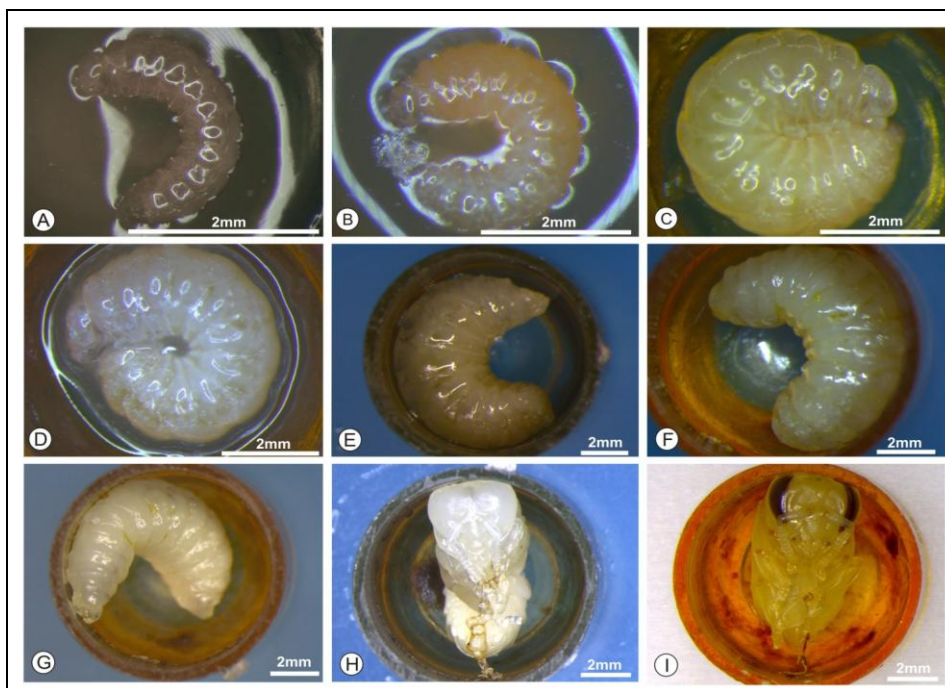
Durante o período de pupação, foi possível verificar a presença de pupas com desenvolvimento anormal, conforme mostra a Figura 3. Além disso, quando se comparou o grupos expostos com o grupo controle, verificou-se que a porcentagem de anomalias foi mais alta nas doses a partir de 15 ng/μL, e que a mais elevada foi na concentração de 500 ng/μL (Figura 4). No entanto foram observadas, diferenças significativas apenas para a dose de 500 ng/μL (Qui-quadrado, $p < 0,05$).

Após o período de pupação, pudemos observar a porcentagem de emergência das abelhas no grupo controle como também nos grupos expostos do d-17 ao d-19 conforme Figura 5. Diferenças entre o grupo controle e os grupos expostos, foram fortemente observadas nas doses de 150 e 500 ng/μL (Qui-quadrado, $p < 0,005$). Nos outros grupos expostos, as respostas quanto a emergência variaram, mas não apresentaram significância (Figura5).

Em todos os parâmetros de nossas avaliações, o grupo controle solvente não apresentou diferenças em relação ao grupo controle, demonstrando que a acetona utilizada na diluição não causou efeitos imediatos sobre as larvas e seu posterior desenvolvimento.

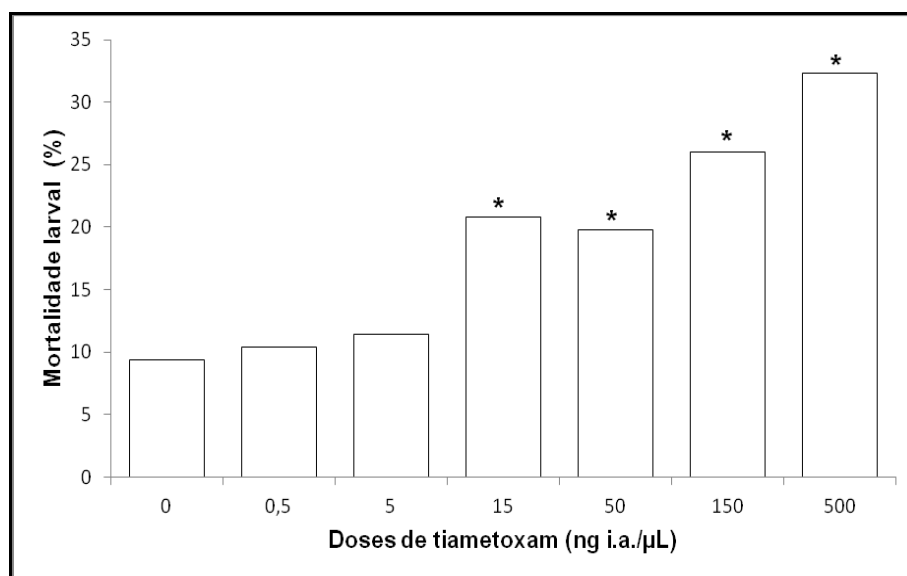
3.4.1 Figuras e Tabelas

Figura 1 – Desenvolvimento de *Apis mellifera* africanizada em condições laboratoriais.



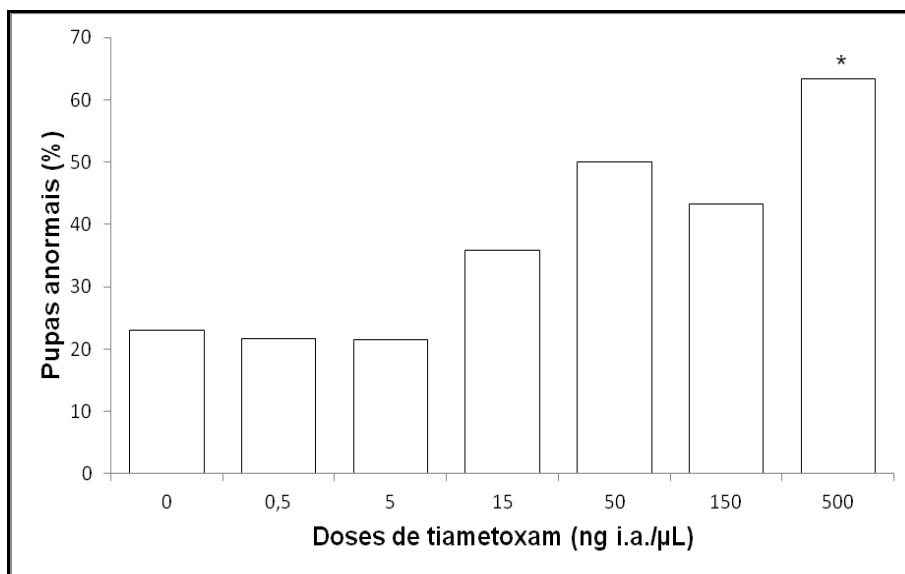
Larvas do grupo controle em condições laboratoriais. A-F, larvas do d-1 ao d-6. Em G, pré-pupa, em H e I, pupa de olhos brancos e marrons respectivamente. Fonte: elaborado pelos autores.

Figura 2 – Efeitos da toxicidade aguda por contato do tiametoxam na porcentagem de mortalidades de larvas de abelhas *Apis mellifera* africanizada.



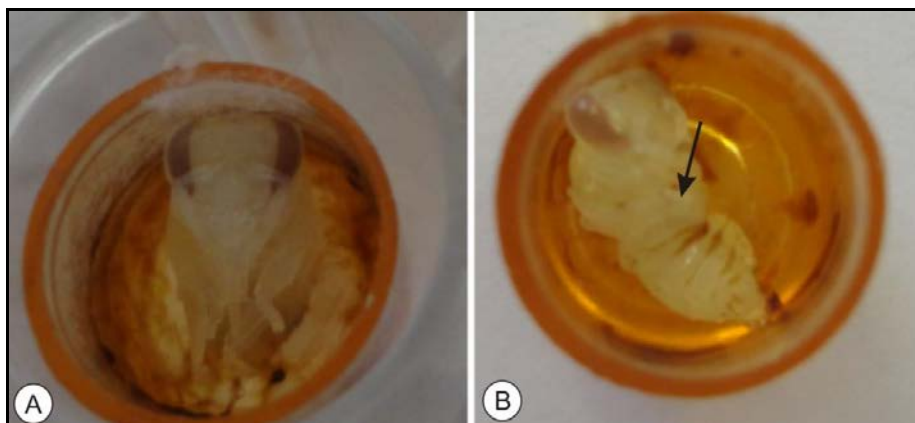
Barras são referentes às mortalidades observadas até 48h de exposição das larvas ao tiametoxam. Diferenças significativas são denotadas através do teste do qui-quadrado (* $p < 0,05$; ns= não significativo) $n = 96$. Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 3 – Efeito do tiametoxam sobre a porcentagem de pupas anormais de *Apis mellifera* africanizada.



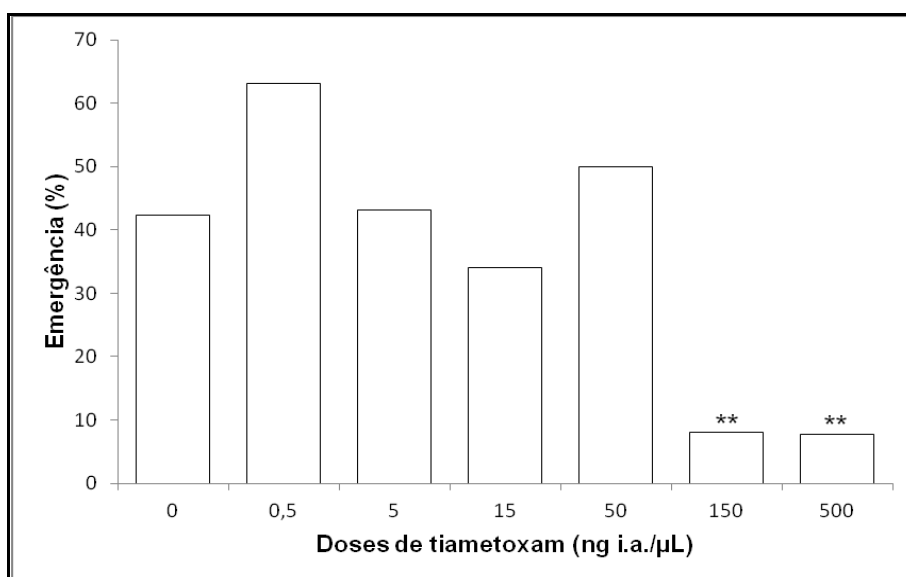
Barras são referentes as porcentagens de anormalias pupais observadas em relação ao número de pupas após a exposição de larvas de *A. mellifera* ao tiametoxam. Diferenças significativas são denotadas através do teste do qui-quadrado (* $p < 0,05$). Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 4 - Pupas de *Apis mellifera* africanizada mantidas em condições laboratoriais.



Em A, pupa do grupo controle sem anormalidades; em B, pupa do grupo exposto à concentração de 500 ng/μL, apresentando anomalia em seus apêndices (seta).

Figura 5 – Efeito do tiametoxam sobre a porcentagem de emergência de *Apis mellifera* africanizada.



Barras são referentes as porcentagens de emergências observadas em relação às pupas, após a exposição de larvas de *A. mellifera* ao tiametoxam. Diferenças significativas são denotadas através do teste do qui-quadrado (** $p < 0,005$). Fonte: Elaborado pelos autores.

Tabela 1. Composição nutricional e concentração dos alimentos empregados na criação *in vitro* de larvas de *Apis mellifera* africanizada (Adaptado de Aupinel et al., 2005).

Ingredientes da Dieta	Concentração dos Ingredientes		
	Dieta A	Dieta B	Dieta C
D-glucose	12 %	15 %	18 %
D-frutose	12 %	15 %	18 %
Extrato de levedura	2 %	3 %	4 %
Geléia real	50 %	50 %	50 %

Fonte: Adaptado de Aupinel et al. (2005).

Tabela 2. Tipos de alimento, quantidade e frequência de alimentação das larvas de *Apis mellifera* criadas *in vitro* (Adaptado de Aupinel et al., 2005).

Dias	d-1	d-2	d-3	d-4	d-5	d-6
Tipo Alimento	A	A	B	C	C	C
Volume (µL)	10	10	20	30	40	50

Fonte: Adaptado de Aupinel et al. (2005)

3.5. DISCUSSÃO

No presente estudo, quando nós avaliamos a mortalidade larval de *A. mellifera* africanizada, após 48h de exposição aguda ao inseticida tiametoxam, notamos diferenças nos grupos expostos em relação ao grupo controle, a partir da concentração de 15 ng/ μ L, sendo que a porcentagem de mortalidade mais elevada foi observada na concentração de 500 ng/ μ L. Embora na concentração de 500 ng/ μ L, as mortalidades tenham sido mais elevadas que no grupo controle e que nas demais concentrações, esta não chegou a atingir 50% dos indivíduos, demonstrando certa tolerância das larvas ao inseticida, diferentemente ao que acontece com as abelhas adultas.

Oliveira et al. (2012) por exemplo, embora em condições pouco diferentes, concluíram pelos de seus estudos, que a concentração de 4,28 ng/ μ L de tiametoxam é suficiente para ocasionar por via oral 50% da mortalidade das abelhas. Mesmo não sabendo exatamente, quanto cada abelha ingeriu de tiametoxam no estudo de Oliveira et al. (2012), é possível presumir que a dose nominal por eles utilizada, e que causa 50% de mortalidade nas abelhas adultas é bem inferior do que 500 ng/ μ L.

Se tratando ainda dos efeitos sobre a mortalidade larval, Yang et al. (2012) em estudos similares ao aqui realizado, avaliaram os efeitos de diferentes doses do neonicotinóide imidacloprido sobre *A. mellifera*, verificaram que a DL_{50} foi de 1400 ng/larva. Esta dose de imidacloprido, também foi considerada mais elevada que quando comparada com abelhas adultas (IWASA et al., 2004).

Aqui, efeitos sobre a mortalidade larval dos grupos expostos quando comparados com o grupo controle, foram mais elevados na dose de 500 ng/ μ L. Tavares et al. (2015), reportaram que a CL_{50} do tiametoxam (por ingestão) para larvas de *A. mellifera* africanizada é na ordem de 14,34 ng i.a./ μ L de dieta contaminada, totalizando uma dose nominal de 430 ng de tiametoxam. Assim, sugerimos que o tiametoxam pode apresentar menor toxicidade quando as larvas são expostas por contato.

Embora os níveis de tiametoxam encontrados no meio ambiente estejam em torno de 1 – 53 ppb, ou seja, 0,001 - 0,053 ng (KRUPKE et al. 2012; MULLIN et al., 2010; STONER; EITZER, 2012; PILLING et al. 2013), a tolerância das larvas durante esta fase de desenvolvimento, não implica a não ocorrência de efeitos da exposição larval em fases posteriores, nem a não ocorrência de efeitos subletais sobre o organismo (DESNEUX et al., 2007). Aqui, por exemplo, nós averiguamos que houve um consequente aumento no aparecimento de anormalidades nas pupas do grupo exposto a 500 ng/ μ L, como também uma

drástica diminuição na porcentagem de das abelhas emergentes, especialmente nas doses de 150 e 500 ng/ μ L, sendo que estas não chegaram nem a 10% de emergência em relação a pupas.

Atualmente, os estudos sobre os efeitos subletais do tiametoxam para larvas de *A. mellifera*, são escassos. Tavares et al. (2015), verificaram após a exposição a concentrações subletais ao tiametoxam, alterações no cérebro das larvas expostas, que poderão implicar em futuros danos as abelhas adultas. Estudos com doses de campo que variam de 0,2 a 0,006 ppm, tem demonstrado que os neonicotinoides podem causar alterações funcionais no cérebro de *A. mellifera*, além de alterações comportamentais que podem afetar a estabilidade e sobrevivência da colônia (PALMER et al., 2013; WILLIAMSON et al., 2013).

A exposição a baixas doses de inseticidas neonicotinoides pode reduzir a postura da rainha, e conseqüentemente o tamanho da colônia, além de poder aumentar a mortalidade de *Bombus terrestris* (WHITEHORN et al. 2012; GILL et al., 2012). No caso das larvas, Yang et al., (2012) verificaram após a exposição de larvas de *A. mellifera* à dose subletal de 0,04 ng/ μ L do imidacloprido, que embora não houveram alterações sobre a taxa de emergência, houve efeito sobre o aprendizado olfatório das operárias recém emergidas.

Sendo assim, acreditamos que seja interessante a utilização de nossos resultados tanto para futuras avaliações dos efeitos dos inseticidas sobre o desenvolvimento das abelhas, como também para como para respaldar as avaliações de procedimentos para o registro de novos inseticidas, e as revisões daqueles que já existem no mercado.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP, processos: 2012/01498-0 e 2012/50197-2, ao Antonio Sérgio Pascon pelo suporte na coleta das larvas e a Adna Suelen Dorigo pela ajuda na manutenção das larvas em laboratório.

REFERÊNCIAS

- ANDREI. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 8a edição. Editora Andrei: São Paulo, 2009. 1380p.
- 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.
- 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.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; van GESTEL, A.M.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v.21, p.973-972, 2012.
- BROMENSHENK, J.J.; HENDERSON, C.B.; WICK, C.H.; STANFORD, M.F.; ZULICH, A.W.; JABBOUR, R.E.; DESHPANDE, S.V.; MCCUBBIN, P.E.; SECCOMB, R.A.; WELCH, P.M.; WILLIAMS, T.; FIRTH, D.R.; SKOWRONSKI, E.; LEHMANN, M.M.; BILIMORIA, S.L.; GRESS, J.; WANNER, K.W.; CRAMER, R.A. JR. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. **Plos One**, v.5, e13181, 2010.
- CHIARI, W.C.; ARNAUT DE TOLEDO, V.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, C.C.; OLIVEIRA, A.J.B.; SAKAGUTI, E.S.S.; ATTENCIA, V.M.; COSTA, F.M.; MITSUI, M.H. Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 31-36, 2005.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-L. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.52, p. 81-106, 2007.
- DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: DEVILLERS, J. & PHAM-DELÈGUE, M.-H., **Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals**, Taylor & Francis: London, p.56-66, 2002.
- ELLIS, D.J.; EVANS, J.D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**. v.49, n.1, p.134-136, 2010.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: FREITAS, B.M.; PEREIRA, J.O.P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Imprensa Universitária: Fortaleza, 2004. p.19-22.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009, In: <<http://faostat.fao.org>> acesso em julho de 2015.

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.

GILL, R.J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. **Nature** doi: 10.1038/nature11585, 2012.

GIRLING, R.D.; LUSEBRINK, I.; FARTHING, E.; NEWMAN, T.A.; POPPY, G.M. Diesel exhaust rapidly degrades floral odours used by honeybees. **Science**, v.3, p.2779, 2013.

INÁCIO, F. R.; MARCHINI, L.C.; AMBROSANO, G.M.B; MORETI, A.C.C.C. Influência de diferentes espaçamentos de plantio na visitação de *Apis mellifera* L. e na produtividade da cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.). **Magistra**, v. 15, n. 1, p. 93-10, 2003.

IWASA, T.; MOTOYAMA, N.; AMBROSE, J.T.; ROE, M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, v.23, n.5, p.371-378, 2004.

KLEIN, A.-M.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; STEPHAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEM, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of crop pollinators in changing landscape for world crops. **Proceedings Biology Science**, v.274, p.303-313, 2007.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N. M.; AIZEN, M. A.; GEMMILL-HERREN, B.; LEBUHN, G.; MINCKLEY, R.; PACKER, L.; POTTS, S. G.; ROULSTON, T.; STEFFAN-DEWENTER, I.; VAZQUEZ, D. P.; et al. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organism: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecology Letters**, v.10, n.4, p.299-314, 2007.

KRUPKE, C.H.; HUNT, G.J.; EITZER, B.D.; ANDINO, G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PloS One**, v.7, e29268, 2012.

MAIENFISCH, P.; ANGST, M.; BRANDL, F.; FISCHER, W.; HOFER, D.; KAYSER, H.; KOBEL, W.; RINDLISBACHER, A.; SENN, R.; STEINEMANN, R.; WIDMER, S. CHEMISTRY and biology of thiametoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v.77, n.10, p.906-13, 2001.

MORETI, A.C.C.C.; SILVA, R.M.B.; SILVA, E.C.A.; ALVEZ, M.L.T.M.F; OTSUK, I.P. Aumento na produção de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) pela ação de insetos polinizadores. **Scientia Agricola**, v. 53, n. 3, p. 34-40, 1996.

MULLIN, C.A.; FRAZIER, M.F.; FRAZIER, J.L.F.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J.S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PloS one**, v. 5, e9754, 2010.

NAUEN, R.; BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**, v.10, n.6, p.241-245 2002

NEUMANN, P.; CARRECK, N. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, v.49, n.1, p.1-6, 2010.

OECD.Guidelines for testing of chemicals: **Honeybees, acute oral toxicity test**. 1998.

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

OLIVEIRA, R.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, p.1122-1133, 2012.

OLIVEIRA-SILVA, J.J.; ALVES, S.R.; MEYER, A.; PEREZA, F.; SARCINELLI, P.N.; da COSTA MATTOS, R.C.; MOREIRA, J.C. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 35, p. 130-5, 2001.

PALMER, M.J.; MOFFAT, C.; SARANZEWA, N.; HARVEY, J.; WRIGHT, G.A.; CONNOLLY, C.N. Cholinergic pesticides cause mushroom body neural inactivation in honeybees. **Nature**, doi: 10.1038/ncomms2648, 2013.

PETTIS, J.S.; LICHTENBERG, E.M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; vanENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **Plos One**, v.98, e70182, 2013.

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, n.1, p.71-83, 2005.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Electrón Veterinaria**, v. 7, n. 3, Mar. 2007.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M **Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 29 p. 2004.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, v.316, p.970-972, 2007.

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, e39114, 2012.

TAVARES, D.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. *In vitro* effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v.135, p.370-378, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. **Pest Management Sci**, v. 57, 914-922, 2001.

vanENGELSDORP, D.; MEIXNER, M.D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.10, p.10-16, 2009.

van ENGELSDORP, D.; SPEYBROECH, N.; EVANS, J.D.; NGUYEN, B.K.; MULLIN, C. Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. **Journal of Economic Entomology**, v.103, p.1517-1523, 2010.

WHITEHORN, P.R.; CONNOR, S.O.; WACKERS, F.L.; GOULSON, D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science** doi: 10.1126/science.1215025, 2012.

WILLIAMSON, S.M.; WRIGHT, G.A. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **Journal Experimental Biology** doi: 10.1242/jeb.083931, 2013.

YANG, E.C.; CHANG, H.C.; WU, W.Y.; CHEN, Y.W. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **PloS One**, v.7, e49472, 2012.

4 CAPÍTULO 2: EFEITOS SUBLETAIS DO TIAMETOXAM SOBRE OS ESTÁGIOS PÓS-EMBRIONÁRIOS DE *Apis mellifera*

Daiana Antonia Tavares,^{1*} Claudia Dussaubat,² André Kretzschmar,³ Stephan Malfitano Carvalho,⁴ Osmar Malaspina,¹ Elaine C.M. Silva-Zacarin⁵, Luc P. Belzunces,²

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de abelhas (LECA) - Centro de estudos de insetos sociais (CEIS) - Departamento de biologia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”(UNESP), Rio Claro, São Paulo.

² Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - UR 406 - Abeilles et Environnement, 84914 Avignon Cedex 9, France.

³ Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) - UR 546 - Biostatistique et Processus Spatiaux, CS 40509, Avignon, France.

⁴ UFU, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

⁵ Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) - Departamento de Biologia - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, São Paulo.

RESUMO

O tiametoxam é um inseticida sistêmico, amplamente utilizado para o controle de insetos-praga. Devido a sua característica sistêmica, ele é facilmente translocado no sistema das plantas, contaminando o pólen, néctar e outras partes florais. Consequentemente, as larvas de abelhas podem ser expostas ao tiametoxam, mas ainda pouco se sabe sobre os efeitos no desenvolvimento pós-embrionário das abelhas, como é o caso de *Apis mellifera*. Neste trabalho, os efeitos subletais do tiametoxam foram investigados em larvas, pupas e operárias recém-emergidas, por meio da exposição aguda por alimento contaminado com 0,00001; 0,001 e 1,44 ng/ μ L de dieta deste inseticida durante o estágio larval, em condições laboratoriais. Após a exposição, o tiametoxam apresentou efeito sobre a sobrevivência de larvas e, sobre tudo, sobre pupas com consequente redução na porcentagem de abelhas emergentes. As mortalidades permitiram-nos observar, que os estágios de transição durante o desenvolvimento pós-embrionário, são fases que podem apresentar vulnerabilidade aos xenobióticos. O tiametoxam também aumentou a atividade da acetilcolinesterase (AChE), em todos os estágios de desenvolvimento, glutathione-S-transferase (GST) e carboxilesterase (CaEs) nas pupas, além disso, não foram observadas diferenças na atividade da fosfatase alcalina (PAL). Esta é a primeira investigação que reporta o perigo de concentrações subletais do tiametoxam sobre o desenvolvimento pós-embrionário de abelhas a partir de uma contaminação na fase larval. Embasados em nossos resultados, nós verificamos que concentrações subletais do tiametoxam podem afetar a sobrevivência da colônia.

Palavras-chave: Neonicotinoides. Pupas. Toxicidade. Recém-emergidas

4.1 INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera*, são insetos muito importantes economicamente e ecologicamente, uma vez que contribuem com aproximadamente 80% da polinização da agricultura global, além de exercerem um papel crucial na polinização e manutenção de áreas naturais (KLEIN et al., 2007). Sua importância econômica também é baseada, na síntese dos produtos apícolas (mel, cera, própolis e geleia real). O valor econômico da polinização em escalas globais é de aproximadamente 153 bilhões de euros, conforme estimativas realizadas no ano de 2005 (GALLAI et al., 2009).

Com os crescentes relatos sobre o desaparecimento das abelhas em todo o mundo, as investigações acerca deste fenômeno que foi fortemente marcado pelo sumiço em massa das abelhas nos Estados Unidos, aumentam, com o objetivo de avaliar os fatores chave para este fenômeno, conhecido como CCD (colony collapse disorder) (STOKSTAD, 2007). Dentre as causas suspeitas deste fenômeno, estão os aumentos da degradação ambiental, patógenos, parasitas, como também a crescente utilização de inseticidas (COUSIN et al., 2013; RATNIEKS; CARRECK, 2010).

Dentre os inseticidas, os neonicotinoides destacam-se por sua ampla e eficaz utilização contra insetos-praga, em diversos tipos de culturas agrícolas (BLACQUIÈRE et al., 2012). Eles caracterizam-se por penetrarem no sistema da planta, podendo contaminar o pólen e néctar, recursos os quais as abelhas utilizam como fonte de alimentação (RORTAIS et al., 2005). Pertencente a esta classe, o tiametoxam, considerado um neonicotinoide de segunda geração (MAIENFISCH et al., 2001), atua como agonista nos receptores de nicotina e acetilcolina dos insetos (nAChR) (TOMIZAWA; CASIDA., 2003), e pode afetar a sobrevivência das abelhas (HENRY et al., 2012).

Pelo fato das abelhas *A. mellifera*, forragearem áreas em torno de 10 km ao redor da colônia em busca de recursos florais, as abelhas forrageiras podem entrar em contato direto com as fontes de contaminação. Além disso, larvas também podem ser expostas aos resíduos de neonicotinoides, através, por exemplo, do pólen e néctar contaminados, cera contaminada ou contato com abelhas contaminadas. (COUVILLON et al., 2014; DESNEUX et al., 2007; JOHNSON). Resíduos de tiametoxam têm sido encontrados no pólen e néctar provenientes das flores, como também naqueles estocados no interior da colônia, além também da cera. Os níveis mínimos e máximos giram em torno de 1 – 53ppb, e dados exatos sobre quantidades presentes no alimento larval permanecem não claros (KRUPKE et al., 2014; MULLIN et al., 2010; PILLING et al., 2013; STONER; EITZER, 2012)

Até o momento, os efeitos subletais que podem ser causados pela exposição de larvas de abelhas aos neonicotinoides, como também suas futuras implicações no desenvolvimento pós-embrionário, são pouco explorados. (BLACQUIÈRE et al., 2012; DESNEUX et al., 2007). O período pós-embrionário, pode ser considerado uma fase crucial, a qual, danos decorrentes de exposição aos xenobióticos, podem causar danos irreversíveis aos indivíduos, ou mesmo a colônia. Embora os estudos neste período sejam escassos, de acordo com os níveis de neonicotinoides encontrados em campo, investigações tem demonstrado que esses pesticidas podem diminuir a taxa de crescimento, a produção do ninho, como também aumentar a mortalidade em populações de *Bombus terrestris* (ELSTON et al., 2013; GILL et al., 2012; LAYCOCK et al., 2014).

O sistema enzimático das abelhas pode apresentar diferentes respostas frente à exposição aos xenobióticos tais como neonicotinoides. Por estar relacionada com a metabolização dos agrotóxicos, a resposta enzimática é fundamental para a compreensão dos mecanismos que envolvem este processo, como também na habilidade do organismo se adaptar a alterações ambientais (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; GILBERT; WILKINSON, 1973; JOKANOVIC et al., 2001; YU et al., 1984;).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) ocorre predominantemente no cérebro, e tem como função hidrolisar a acetilcolina das sinapses colinérgicas, mediando a transmissão neural (BADIOU et al., 2008). Carboxilesterases (CaEs) e Glutathione-S-transferase (GST) são enzimas de desintoxicação de fase I e II respectivamente. São consideradas relevantes, por terem um papel na neutralização dos xenobióticos podendo ser encontradas em diferentes tecidos (YU et al., 1984; MAXWELL, 1992; DIAO et al., 2006). Finalmente, fosfatase alcalina (PAL) é uma enzima digestiva que através da hidrólise do grupo fosfato, atua em mecanismos de transporte e absorção (MOSS, 1992).

Assim, pautados na importância das abelhas, como também na falta das avaliações subletais dos efeitos do tiametoxam, sobre tudo, durante o desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera*, foi aplicada a metodologia proposta por Aupinel et al. (2005) e (2007), recentemente adotada pela OECD (2013), para avaliar os efeitos do tiametoxam sobre larvas, pupas e operárias recém-emergidas, submetidas a exposição subletal aguda de larvas ao tiametoxam em condições laboratoriais. Foram analisadas a sobrevivência, a porcentagem de emergência como também a atividade enzimática de AChE, GST, CaEs e PAL frente à exposição, e os dados discutidos.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Procedimentos experimentais

Foram selecionadas quatro colônias de *Apis mellifera mellifera* L., 1758 pertencentes ao apiário do INRA (Avignon, França) que se encontravam saudáveis e em boas condições para coleta. Três dias antes do experimento, foram colocados quadros limpos no interior das colônias e a rainha isolada em caixa excludora, para a realização da oviposição. No 4º dia (d-4), larvas de 1º instar foram transferidas, com o auxílio de uma espátula de coleta estéril em inox, para cúpulas plásticas. Antes da transferência, e de acordo com Aupinel et al. (2005); (2007), as cúpulas foram desinfetadas em solução de dicloroisocianurato de sódio 0,4% durante 30 minutos. Na sequência, as cúpulas foram devidamente organizadas no fluxo laminar, para secagem e drenagem da solução, durante aproximadamente 30 minutos. Após isso, as cúpulas foram organizadas em placas de cultura celular de 48 poços, estéreis, que continham em seu interior $\frac{1}{4}$ de algodão dental embebidos em 500 μ L de solução de glicerol 15% e dicloroisocianurato de sódio 0,4%. Do d-1 ao d-7, as larvas foram armazenadas em caixas herméticas do tipo Nalgene, temperatura 34° C, e umidade relativa (UR) de 95%, que foi mantida através de solução de K_2SO_4 140 g/L. Após o d-7, (d-7 ao d-15) a temperatura foi mantida, e a UR foi controlada em 80%, e a solução foi substituída por NaCl 400 g/L, durante este período não foi fornecido dieta. No d-15, a fim de simular as condições da colônia, as placas foram individualmente fechadas, com uma delicada camada de cera virgem e pequenos orifícios foram abertos para a circulação de ar. Cada placa foi arranjada em potes plásticos na posição vertical, com o auxílio de fita adesiva. Os potes foram acondicionados em estufa, com 50 %UR, e após a organização das placas, foi adicionado cãndi e água não contaminadas.

2.2 Composições das dietas larvais

Para a alimentação larval, as dietas foram compostas de uma solução de 50 % de geleia real adquirida de ICKO (Ickowicz, França) e 50 % de solução açucarada em diferentes proporções, 12 % de glicose e frutose, 2 % de extrato de levedura (dieta A), 15 % de glicose e frutose, 3 % de extrato de levedura (dieta B) e por último 18 % de glicose e frutose, 4 % de extrato de levedura (dieta C). As larvas foram alimentadas do 1-d ao dia d-6, com exceção do d-2, considerado período de aclimação larval, nas seguintes proporções: d-1 20 μ L de dieta A, d-3 20 μ L de dieta B, e d-4, d-5 e d-6, 30, 40 e 50 μ L respectivamente de dieta C. Os açúcares e o extrato de levedura foram adquiridos de Sigma-Aldrich (France).

4.2.3 Exposição aguda de larvas de *Apis mellifera* ao tiametoxam

Para nossas investigações, nós selecionamos três concentrações subletais o tiametoxam, sendo elas: 0,00001; 0,001 e 1,44 ng/ μ L de alimento. As concentrações por nós selecionadas para trabalho são baseadas em estudos previamente realizados. No caso das duas primeiras, correspondem ao que aproximadamente, tem sido encontrado no pólen e néctar (KRUPKE et al., 2014; MULLIN et al., 2010; PILLING et al., 2013; STONER; EITZER, 2012), e no caso da terceira, a concentração corresponde a 1/10 da CL₅₀, previamente estabelecida para *A. mellifera* (TAVARES et al., 2015), e pode ser utilizada como parâmetro de comparação, uma vez que é uma concentração considerada elevada. Tiametoxam foi adquirido Dr. Ehrenstorfer GmbH (98,5 % de pureza), e adicionado diretamente no alimento larval, a partir de soluções estoque concentradas (3x), preparadas em água destilada obtendo assim 0,00001; 0,001 e 1,44 ng/ μ L de dieta C. O grupo controle, recebeu somente dieta C não contaminada. As larvas dos grupos expostos foram contaminadas com tiametoxam através de 30 μ L de dieta C, sendo assim, receberam 0,0003; 0,03 e 43,2 ng/ μ L (doses nominais). O consumo do alimento após a contaminação foi cuidadosamente averiguado. Mortalidades larvais foram individualmente checadas com o auxílio de lupa nos dias d-5, d-6, d-8, mortalidades pupais foram checadas d-11, d-13, d-15 até a emergência, pela diferença do número entre abelhas emergentes e não emergentes. A porcentagem de emergência das abelhas foi checada entre d-17 e d-20, foram consideradas emergentes as abelhas que individualmente cortaram a cera e saíram das placas. Foram realizados três repetições experimentais, adotando as mesmas condições procedimentais. Os experimentos foram conduzidos entre os meses de maio e junho de 2014. Para cada experimento, nós consideramos uma réplica como sendo uma placa de cultura celular com 48 indivíduos, sendo que, o experimento 1 (E1), e experimento 2 (E2) foram realizados em duplicata, (n= 96 indivíduos), e o experimento 3 (E3) realizado em triplicata (n= 144).

4.2.4 Análises das atividades enzimáticas

Após a exposição ao tiametoxam, foram coletadas larvas (5º instar), pupas (pupas de olho preto Pbl) e operárias recém-emergidas, levando em consideração a importância dos estágios de desenvolvimento (CRUZ-LANDIM, 2009; MICHELLETE; SOARES, 1993). O Material coletado foi armazenado a – 20° C. As enzimas AChE e GST foram extraídas das larvas (corpo inteiro) e da cabeça de pupas e recém-emergidas através de um corte com tesoura de dissecação que separou a cabeça do corpo. CaEs e ALP foram extraídas das larvas

(corpo inteiro) abdômen (pupas) e intestino médio (recém-emergidas) através da remoção pela extremidade inferior do abdômen de recém-emergidas, com o auxílio de uma pinça de dissecação. Para larvas e pupas, pelo fato de terem o corpo mais delicado o que dificulta ou até mesmo inviabiliza a dissecação, nos optamos no caso das larvas, de extrair as enzimas do corpo inteiro, e no caso das pupas para CaEs e ALP de extrair do abdômen.

4.2.4.1 Extração das enzimas

A atividade de cada amostra foi determinada a partir de 3 poços que continham (3 larvas, cabeças, intestinos ou abdomens) em triplicata, sendo que para cada condição analisamos 7 amostras, (n= 21 por grupo). As amostras foram homogenizadas com o auxílio (Qiagen®) (5 x10 s at 30 Hz) em solução de extração, cuja quantidade foi previamente calculada de acordo com o peso de cada amostra (10% p/v de extrato). A solução de extração era composta de (10 mM NaCl, 1% (w/v), Triton X-100 e 40 mM fosfato de sódio pH 7.4, como também uma mistura dos inibidores de proteases, 2 mg/ml de antipain, leupeptin and pepstatin A, 25 units/ml de aprotinin and 0.1 mg/ml de trypsin). Os extratos dos tecidos foram centrifugados durante 20 min a 15,000 g, resultando em sobrenadantes que foram coletados e utilizados para as análises. Toda a extração foi realizada a 4° C.

4.2.4.2 Ensaios enzimáticos

Os ensaios enzimáticos foram realizados em espectrofotômetro (Tecan infiniti F500®) a 25° C. A atividade da AChE foi avaliada através de 5 µL de extrato de tecido com 0,3 mM acetilcolina iodo, 1,5 mM de DTNB e 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (volume final 200 µL). A atividade foi avaliada a 412 nm durante 5 minutos. A atividade da GST foi avaliada através de 5 µL de extrato para larvas e pupas, e 10 µL de extrato de tecido para recém emergidas com 2,5 mM de glutathione reduzida, 1 mM de EDTA, 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e 100 mM fosfato de Na/K pH 7.4 (volume final 200 µL). A atividade foi avaliada a 340 nm por 5 min. A atividade da CaEs foi conduzida através de 5 µL de extrato de tecido com 0,01 de BW284C51 diluído em água destilada 1/10, 0,1 de *p*-nitrofenil acetato diluído em água destilada 1/10, e 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 7,5. A atividade foi avaliada a 410 nm por 5 min (volume final 200 µL). Por último, a atividade da ALP foi avaliada através de 20 µM de MgCl₂, 2 mM de *p*-nitrofenil fosfato como substrato e 100 mM de tampão tris-HCL pH 8,5. A atividade foi avaliada a 410 nm por 5 min, (volume final 200 µL).

4.2.4 Análise estatística

Dados de sobrevivência, análises enzimáticas e mortalidades foram analisados usando os softwares de estatística R Development Core Team (2012). As análises de sobrevivência foram feitas através do modelo de regressão de Cox, e diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. As análises enzimáticas foram feitas através do teste de Mann Whitney. Os grupos expostos foram individualmente comparados com o respectivo controle e diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. A influência do tiametoxam sobre a porcentagem de emergência foi analisada através dos resultados obtidos do teste do qui-quadrado, comparando individualmente os grupos exposto com o controle, e diferenças significativas foram denotadas quando $p < 0,001$.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Mortalidade

A exposição oral aguda, de larvas de abelhas *A. mellifera* ao tiametoxam mostrou efeitos tóxicos durante a fase larval, do grupo exposto à concentração de 1,44 ng/μL (Cox model $p < 0,01$; Figura 1) a partir do 4º dia de exposição. Alterações no tempo de sobrevivência foram constatadas para pupas dos grupos expostos a 0,001 ng/μL e 1,44 ng/μL de tiametoxam, com diferenças significativas (Cox model $p < 0,05$; Figura 2), sendo o grau de significância ainda maior para a concentração de 1,44 ng/μL (Cox model $p < 0,01$; Figura 3). Resultados não significantes foram observados para larvas e pupas do grupo exposto a 0,00001 ng/μL de tiametoxam.

Foi possível observar que os resultados observados durante a fase larval e pupal, refletiram diretamente na porcentagem dos indivíduos emergentes. Comparados com os grupos controle, diferenças significativas foram notadas na porcentagem de emergência dos grupos expostos a 0,001 ng/μL e 1,44 ng/μL (Qui-Square test $p < 0,001$; Figura 3). Adicionalmente, verificamos que altas porcentagens de mortalidades de *A. mellifera*, em todos os grupos, ocorreram durante os períodos de transições de larva para pupa e pupa para adulto, correspondentes ao dia 13 e dia 20 do experimento (Figura 4).

4.3.2 Efeitos do thiamethoxam sobre a atividade enzimática de larvas, pupas e recém-emergidas

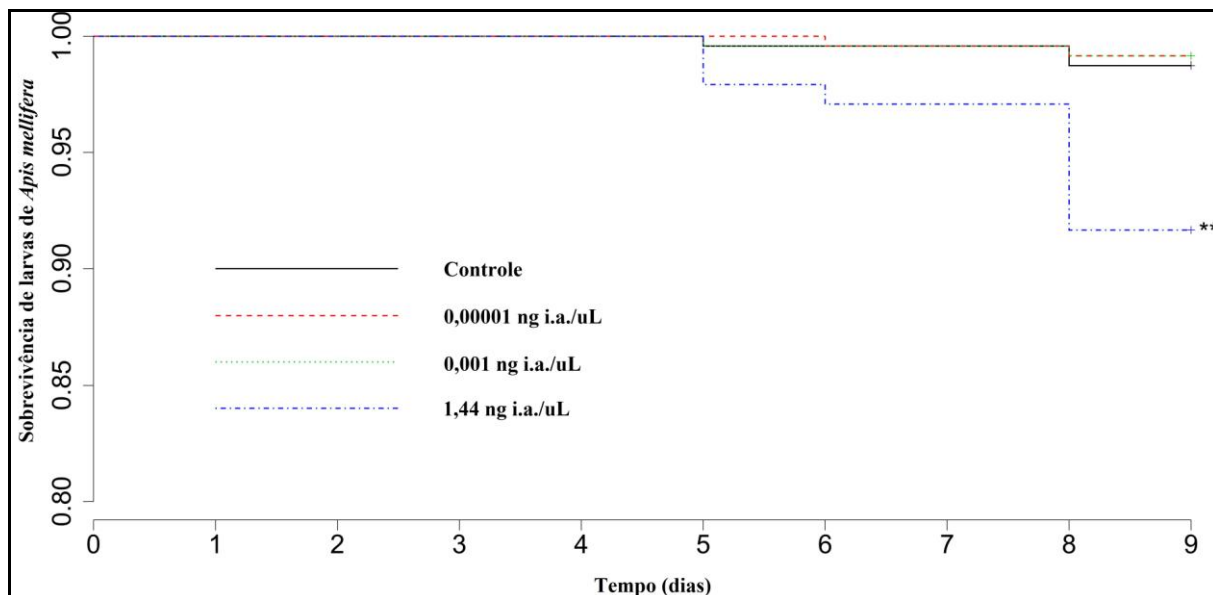
As análises dos efeitos da exposição aguda de larvas de *A. mellifera* ao tiametoxam, foram realizadas durante os estágios: larval, pupal e em operárias recém-emergidas. O tiametoxam teve efeito sobre a atividade tecidual da AChE para larvas, pupas e recém-emergidos dos grupos expostos quando comparados com os respectivos grupos controle conforme Figura 5. As larvas expostas a 1,44 ng/μL, apresentaram um aumento na atividade tecidual da AChE correspondendo a $7,56 \pm 0,40$ mUA/min/mg (valor do controle $5,51 \pm 1,26$ mUA/min/mg) (Mann-Whitney U tests $p < 0,05$). Para pupas e recém-emergidas expostas, a atividade neural da AChE, apresentou aumento significativo em todos os grupos expostos ($p < 0,05$, Mann-Whitney U tests). Para pupas, os níveis de AChE dos grupos expostos a 0,00001, 0,001 e 1,44 ng/μL, foram de $61,06 \pm 11,54$; $55,80 \pm 10,82$ e $60,30 \pm 6,99$ mUA/min/mg de tecido respectivamente (valor do controle $40,99 \pm 6,93$ mUA/min/mg de tecido). A atividade tecidual da AChE para recém-emergidas dos grupos expostos a 0,00001, 0,001 e 1,44 ng/μL foram de $114,38 \pm 11,02$; $117,14 \pm 9,91$ e $117,47 \pm 8,77$ mUA/min/mg de

tecido respectivamente (valor do controle $93,28 \pm 9,89$ mUA/min/mg de tecido). As atividades teciduais da GST e CaEs das pupas, aumentaram significativamente em todos os grupos expostos em relação ao grupo controle ($p < 0.05$, Mann-Whitney U tests Figuras 6 e 7). A atividade da GST em pupas dos grupos 0,00001, 0,001 e 1,44 ng/ μ L foram de $202,26 \pm 6,99$; $197,16 \pm 3,16$; $194,75 \pm 2,31$ mUA/min/mg de tecido respectivamente (valor do controle $188,82 \pm 6,27$ mUA/min/mg de tecido). A atividade da CaEs em pupas dos grupos de 0,00001; 0,001 e 1,44 ng/ μ L foram de $201,88 \pm 6,99$; $196,78 \pm 3,16$; $194,37 \pm 2,31$ mUA/min/mg de tecido respectivamente (valor do controle $188,45 \pm 6,27$ mUA/min/mg de tecido). GST, CaEs e ALP não apresentaram significância para larvas e recém-emergidas (Figuras 6, 7 e 8). A atividade tecidual da ALP, não foi detectada para pupas, uma vez que o padrão das curvas analisadas foi similar aos grupos controle da placa (poços brancos) (Figura 8).

Adicionalmente, numa análise global dos resultados dos testes enzimáticos, os níveis de AChE, GST, CaEs e ALP em larvas (enzimas extraídas da cabeça e corpo), pupas e recém-emergidas (AChE e GST extraídas da cabeça, CaEs e ALP extraídas do intestino e abdômen respectivamente) apresentaram diferenças de acordo com o estágio de desenvolvimento em todos os grupos (Figuras 5, 6, 7 e 8). AChE teve seus níveis em escala crescente no decorrer do desenvolvimento, (Figura 5), sendo $5,51 - 7,56$ para larvas, $40,99 - 61,06$ para pupas e por último $93,28 - 117,47$ para recém-emergidas. Ao contrário, GST apresentou níveis decrescentes de acordo com a fase de desenvolvimento, sendo o menor índice encontrado em recém-emergidas (Figura 6). Já as CaEs, apresentaram níveis similares nas fases de larva e recém-emergidas, e um aumento na fase de pupa (Figura 7). Por último, ALP teve níveis similares para larvas e recém-emergidas (Figura 8).

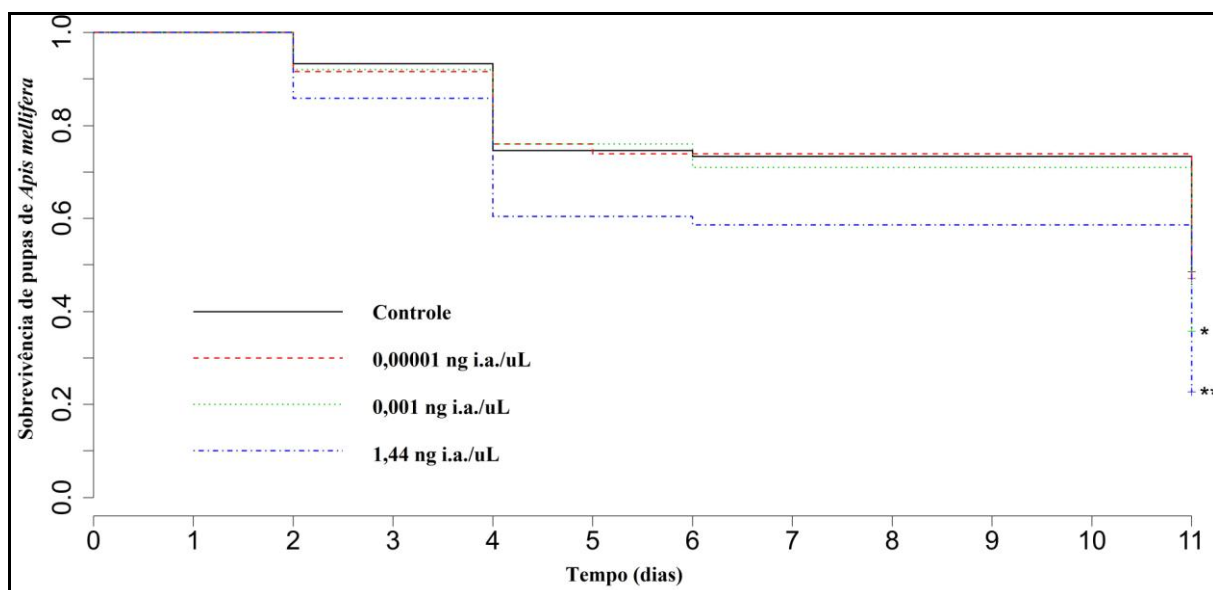
4.3.1 Figuras

Figura 1 – Efeitos de doses subletais de tiametoxam na sobrevivência de *Apis mellifera* larval.



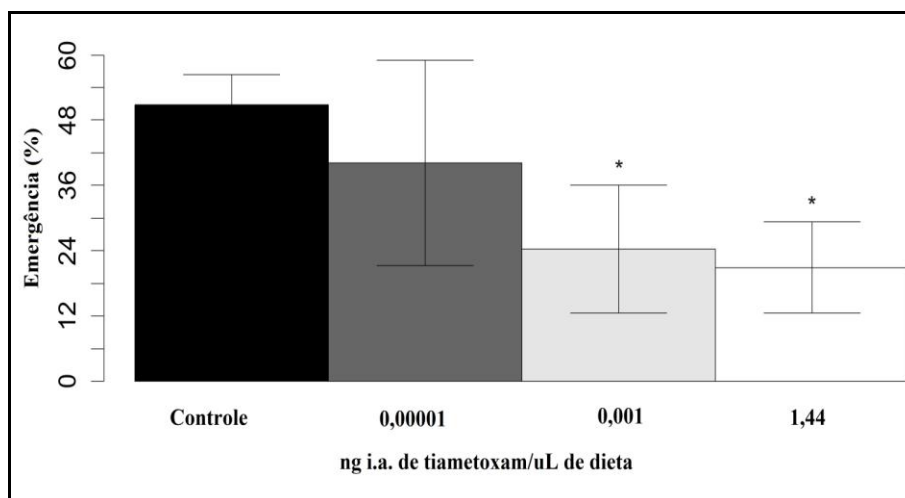
Os dados mostram a porcentagem de sobrevivência ao longo dos dias após a exposição. Asteriscos denotam diferenças significantes entre grupo exposto e grupo controle (** $p < 0,01$ Cox model). Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 2 – Efeitos de concentrações subletais de tiametoxam na sobrevivência de *Apis mellifera* pupal.



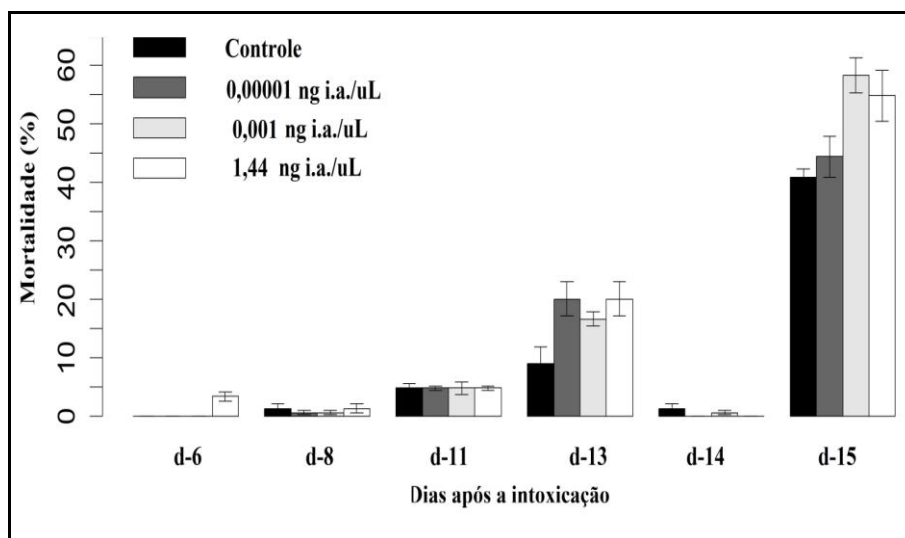
Os dados mostram a porcentagem de sobrevivência ao longo dos dias após a exposição. Asteriscos denotam diferenças significantes entre grupo exposto e grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ Cox model). Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 3 – Efeito da exposição larval de *Apis mellifera* ao tiametoxam por ingestão no dia 4, sobre a porcentagem de emergência.



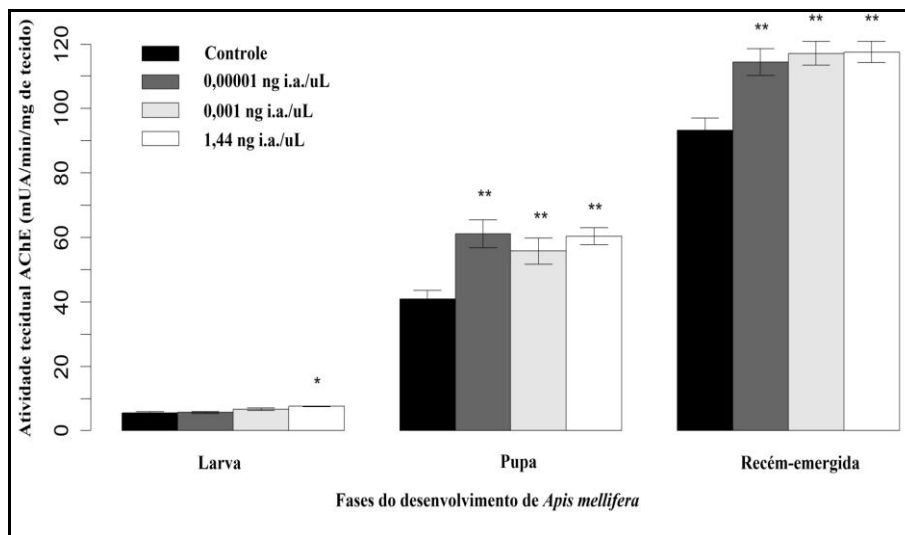
A porcentagem foi calculada a partir número de pupas (n controle = 120; n 0,00001 ng/μL = 107; n 0,001 ng/μL = 111; n 1,44 ng/μL = 105). As porcentagens de emergentes foram comparadas com o grupo controle, usando o Teste do Qui-quadrado (* $p < 0,001$). As barras representam o desvio padrão de três replicatas. Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 4 – Efeito da exposição larval de *Apis mellifera* ao tiametoxam na mortalidade, durante o desenvolvimento pós-embrionário.



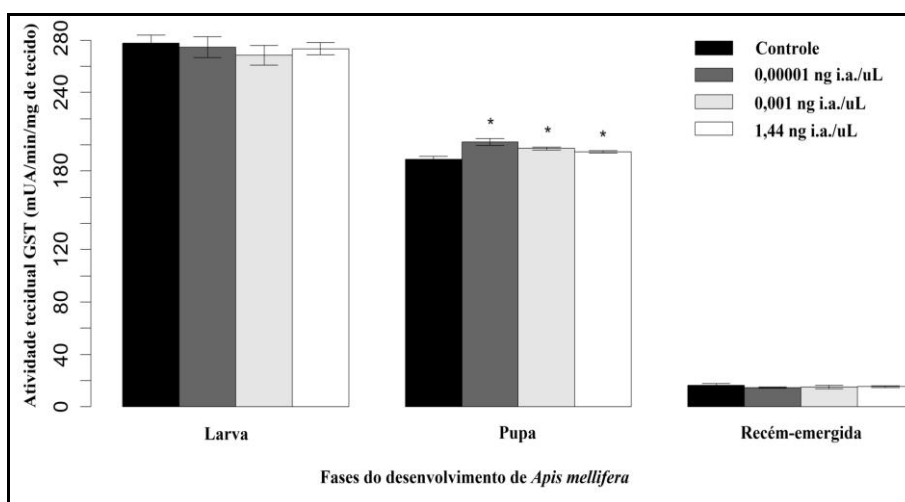
Barras representam o desvio padrão das triplicatas, n= 144. Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 5 – Efeitos de concentrações subletais do tiametoxam sobre a atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) em larvas, pupas e operárias recém-emergidas em condições laboratoriais.



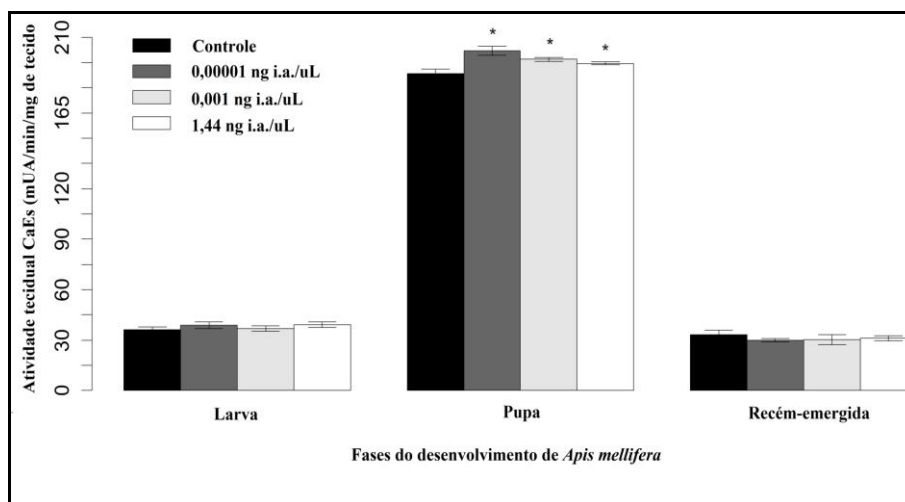
A atividade enzimática foi avaliada a partir de extratos do corpo inteiro de larvas, e da cabeça de pupas e operárias recém-emergidas. As barras mostram o resultado da leitura de 7 triplicatas de extratos contendo 3 (corpos/cabeça) de larvas de 5º instar, pupas (olho marron-preto) e operárias recém emergidas, (n= 28 indivíduos por grupo). Asteriscos denotam diferenças significativas dos grupos expostos comparados com os respectivos grupos controles (*p < 0.05, ** p < 0.005, teste de Mann-Whitney). Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 6 - Efeitos de concentrações subletais do tiametoxam sobre a atividade enzimática da glutathione S transferase (GST) em larvas, pupas e operárias recém-emergidas em condições laboratoriais.



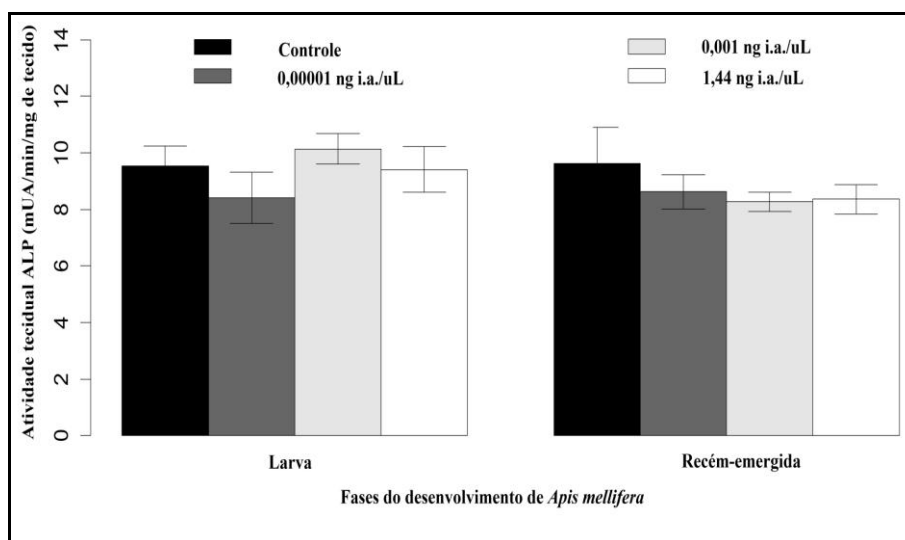
A atividade enzimática foi avaliada a partir de extratos do corpo inteiro de larvas, e da cabeça de pupas e operárias recém-emergidas. As barras mostram o resultado da leitura de 7 triplicatas de extratos contendo 3 (corpos/cabeça) de larvas de 5º instar, pupas (olho marron-preto) e operárias recém emergidas, (n =28 indivíduos por grupo). Asteriscos denotam diferenças significativas dos grupos expostos comparados com os respectivos grupos controles (*p < 0.05, teste de Mann-Whitney). Elaborado pelos autores.

Figura 7 - Efeitos de concentrações subletais do tiametoxam sobre a atividade enzimática da carboxilesterase (CaEs) em larvas, pupas e operárias recém-emergidas em condições laboratoriais.



A atividade enzimática foi avaliada a partir de extratos do corpo inteiro de larvas (A), e da cabeça (B) e (C) de pupas e operárias recém-emergidas. As barras mostram o resultado da leitura de 7 triplicatas de extratos contendo 3 (corpos/cabeça) de larvas de 5º instar (A), pupas (olho marron-preto) (B) e operárias recém emergidas (C), ($n=28$ indivíduos por grupo). Asteriscos denotam diferenças significativas dos grupos expostos comparados com os respectivos grupos controles (* $p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).

Figura 8 - Efeitos de concentrações subletais do tiametoxam sobre a atividade enzimática da Fosfatase alcalina (PAL) em larvas, e operárias recém-emergidas em condições laboratoriais.



A atividade enzimática foi avaliada a partir de extratos do corpo inteiro de larvas (A), e da cabeça (B) de operárias recém-emergidas. As barras mostram o resultado da leitura de 7 triplicatas de extratos contendo 3 (corpos/cabeça) de larvas de 5º instar (A), pupas (olho marron-preto) (B) e operárias recém emergidas (C), ($n=28$ indivíduos por grupo). Asteriscos denotam diferenças significativas dos grupos expostos comparados com os respectivos grupos controles ($p < 0.05$, teste de Mann-Whitney).

4.4 DISCUSSÃO

Concentrações subletais do tiametoxam diminuíram o tempo de sobrevivência das larvas (1,44 ng/ μ L) e pupas (1,44 ng/ μ L e 0,01 ng/ μ L) após a exposição, em relação ao grupo controle, como também, afetaram diretamente a porcentagem de abelhas emergentes. Os efeitos sobre a sobrevivência larval foram observados a partir do d-8 após a exposição, no grupo 1,44 ng/ μ L de tiametoxam, sendo mais acentuado no período pupal nos grupos expostos a 1,44 ng/ μ L e 0,01 ng/ μ L. Esses resultados demonstram uma diferença entre o presente estudo, com os testes de toxicidade aguda convencionais, em que geralmente, os efeitos decorrentes da exposição surgem em média com 24h ou 48h após a intoxicação, além de evidenciar que a sobrevivência das larvas e pupas pode ser alterada em decorrência de uma exposição subletal ao tiametoxam, durante a fase larval, acarretando redução significativa na porcentagem de emergência.

Há uma escassez de estudos na literatura, que avaliem os efeitos do tiametoxam ou mesmo de outros inseticidas, sobre o desenvolvimento de *A.mellifera* se comparados com os estudos realizados com adultos (COUSIN et al., 2013; DESNEUX et al., 2006; YANG et al., 2012). Assim, não sabemos ao certo quais são os mecanismos que envolvem as respostas aqui observadas. Sabe-se que no final do 5º instar larval, e início do estágio pupal, o cérebro inicia o processo minucioso de remodelação, para adequar-se às necessidades da fase adulta (CHAPMAN, 1998). Durante a fase larval, o cérebro de *A. mellifera* desempenha funções básicas, uma vez que este período é essencialmente voltado para alimentação, e aquisição de massa corpórea (CHAPMAN, 1998; ROAT; CRUZ-LANDIM, 2010). Sendo assim, é possível, que os sítios-alvo os quais o inseticida atua, não estejam presentes, ou estejam em quantidades insuficientes, impossibilitando sua ação efetiva. Ao contrário, em pupas e recém-emergidas que apresentam o cérebro mais desenvolvido, ou apto a atender as necessidades do indivíduo adulto, esses sítios já estejam presentes em quantidade suficientes para a ação do tiametoxam. Ou ainda, conforme sugerido por Zhu et al. (2014), ao estudarem os efeitos de exposições crônicas de larvas de *A. mellifera* a doses ambientais de fluvalinato, coumafós, clorotalonil, e clorpirifós, a resposta não convencional à toxicidade, pode ser uma consequência do tempo necessário para acumular concentrações internas do inseticida, suficientes para exercer ação nervosa nos alvos presentes no sistema nervoso central das abelhas.

Nós verificamos que, após a exposição ao tiametoxam, como também nos grupos controle, os picos de mortalidades, coincidiram com os períodos de transição dos estágios do desenvolvimento, passagem de larva para pupa (d-13), e pupa para recém-emergidas (d-20).

Esses dados destacam a importância desses períodos, que garantirão o desenvolvimento das abelhas em condições adequadas (CRUZ-LANDIM, 2009), como também uma possível vulnerabilidade à exposição aos neonicotinoides, no nosso caso o tiametoxam. Esta vulnerabilidade durante essas fases podem ter refletido, por exemplo, nos resultados da sobrevivência aqui observados durante o período pupal, como também consequentemente na redução da porcentagem de emergência dos grupos expostos.

No que se refere aos resultados das avaliações enzimáticas, nós constatamos que, após a exposição ao tiametoxam, pupas e recém-emergidas tiveram um aumento significativo na atividade tecidual da AChE, em todos os grupos expostos quando comparados com o grupo controle. Diferentemente, na fase larval, somente a dose de 1,44 ng/ μ L apresentou aumento significativo. Em abelhas melíferas, a AChE é predominantemente encontrada no cérebro, (BELZUNCES et al., 1998). Em abelhas adultas, os nAChR são predominantemente distribuídos entre os corpos pedunculados, lobos antenais, nervos, gânglios visuais, corpo central e gânglio subesofágico (BICKER et al., 1999; KREISS; BICKER., 1989). Progressivamente, juntamente com o desenvolvimento do cérebro, o aumento dos nAChR pode alterar a resposta da atividade da AChE durante o desenvolvimento larval de *A. mellifera*, frente a exposição aos neonicotinoides. Como aqui constatado, a atividade da AChE aumentou progressivamente durante os estágios do desenvolvimento, sendo que a maior atividade foi encontrada em adultos, corroborando com resultados já descritos por Belzunces et al. (1992).

O aumento da atividade da AChE frente a resposta a exposição ao tiametoxam, confirma a efetiva da ação do inseticida, como também consequentemente os danos que este inseticida pode causar durante o desenvolvimento de *A. mellifera*. Yang et al. (2012), concluíram em suas investigações acerca dos efeitos do neonicotinoide imidacloprido administrado durante 4 dias consecutivos, para larvas de *A. mellifera*, uma redução significativa no comportamento associativo olfatório dos adultos do grupo exposto a 0,4 ng, resultados esses que provavelmente decorrem tanto da ação do inseticida, como da alteração dos mecanismos fisiológicos normais do organismo que na ausência do inseticidas não ocorreriam. Além disso, embora não seja alvo de nossas investigações a utilização de AChE como bioindicador de neurotoxicidade, nossos resultados colaboram com as recentes sugestões que vem sendo realizadas (BADIOU et al., 2007; BADIOU et al., 2008; BOILY et al., 2013).

Aqui, GST e CaEs mostraram um aumento na atividade durante a fase de pupa, com diferenças significativas em todos os grupos expostos em comparação com o controle. Por

executarem um importante papel no sistema de desintoxicação (KOSTAROPOULOS et al., 2001), assume-se que a ativação de GST durante a fase de pupa, possui um papel fundamental na defesa, e também na integridade das pupas, assegurando a viabilidade das abelhas recém-emergidas. Além disso, o aumento da atividade da GST sugere, por exemplo, a possível ativação do sistema de estresse oxidativo durante a fase de pupa, devido à exposição ao tiametoxam no estágio de larval, uma vez que a atividade da GST além de estar envolvida com o sistema de desintoxicação, participa também de processos contra danos celulares através do sistema de estresse oxidativo (BABCZYNSKA et al., 2006; BARATA et al., 2005). É possível que o padrão de respostas observados durante a fase larval, deva-se ao fato de que durante esta fase, as larvas possuam grandes quantidades de corpo gorduroso, ao qual ficam associadas as enzimas P450, que são as primeiras enzimas recrutadas no processo de desintoxicação metabólica (DERECKA et al., 2013; LYCETT et al., 2006). Outro fator para as diferentes respostas na atividade enzimática de larvas e pupas em relação a GST e CaEs, pode-se ser devido ao intestino permanecer fechado até o final do 5º instar, dificultando os processos envolvidos na ação e metabolismo de xenobióticos, que serão mais eficazes durante os últimos estágios do desenvolvimento, (CRUZ-LANDIM, 2009).

No presente estudo, a atividade da ALP não foi detectada durante o estágio pupal, provavelmente, suas atividades relacionadas a absorção e hidrólise dos grupos fosfatos, no caso das pupas, ficam inativas, uma vez que durante este período, as atividades digestivas são restritas (CRUZ-LANDIM, 2009; MOSS, 1992; RORTAIS et al., 2005).

De modo geral, os níveis de AChE, GST, CaEs e ALP variaram de acordo com os estágios de desenvolvimento, demonstrando, a possibilidade de que o metabolismo de *A. mellifera* pode ser diferente de acordo com a fase de seu desenvolvimento. Estudos tem demonstrado, que a resposta enzimática frente a exposição aos xenobióticos podem variar Badiou-Bénéteau et al. (2012) e Carvalho et al. (2013) encontraram diferentes respostas na atividade enzimática de AChE, GST, CaEs e ALP a partir da exposição ao tiametoxam.

Baseado nas alterações por nós encontradas, tanto no que se refere à sobrevivência, quanto a resposta das atividades enzimáticas, (especialmente da AChE e GST) durante o desenvolvimento de *A. mellifera*, é importante ressaltar que os resultados significativos observados para os grupos expostos a 0,001 e 0,0001 ng/μL de tiametoxam, merecem um destaque, uma vez que essas concentrações aproximam-se dos níveis de campo, de acordo com estudos, que relatam as quantidades que podem ser encontradas em campo. No pólen e néctar, por exemplo, fontes de alimentação das larvas, os níveis giram em torno de 1 a 53 ppb e 1 a 11ppb respectivamente (KRUPKE et al., 2014; MULLIN et al., 2010; PILLING et al.,

2013; STONER E EITZER., 2012). Embora as avaliações dos efeitos do tiametoxam durante o desenvolvimento larval de *A. mellifera* seja escasso, alguns estudos com *Bombus* sp relatam alterações em relação à mortalidade, desenvolvimento do ninho (ovos e larvas), performance de forrageamento, consumo de alimento, quando as abelhas são expostas a doses de campo de neonicotinoides (GILL et al., 2012; LAYCOCK et al., 2014).

Em resumo, neste estudo nós avaliamos as respostas durante o desenvolvimento de *A. mellifera* frente à exposição subletal aguda ao tiametoxam, com ênfase na sobrevivência e porcentagem de emergência. Também avaliamos a resposta das atividades enzimática da AChE, GST, CaEs e ALP decorrentes da exposição. Um enfoque foi dado às consequências que a exposição durante a fase larval a doses de tiametoxam similares à de campo podem ocasionar, como também discutido as alterações nas atividades enzimáticas da AChE e GST, e os diferentes níveis enzimáticos encontrados ao longo do desenvolvimento. Em suma, pautados nos resultados por nós encontrados, nós concluímos que a exposição aguda a doses subletais ao tiametoxam podem afetar o desenvolvimento de *A. mellifera*, como também alterar as respostas enzimáticas da AChE e GST, com especial atenção às concentrações de 0,001 e 0,00001 ng/ μ L de tiametoxam que apresentam similaridade com os níveis encontrados em campo. Além disso, mudanças nos estágios de *A. mellifera* parecem apresentar períodos de vulnerabilidade à ação de xenobióticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo apoio financeiro e por possibilitar o estágio no exterior (BEPE, processo 2013/21634-8), a G. Kairo, pela ajuda concedida nas coletas larvais e a M. Cousin, pela ajuda com os procedimentos laboratoriais.

REFERENCIAS

- AUPINEL, P.; FORTINI, D.; DUFOUR, H.; TASEI, J.-N.; MICHAUD, B.; ODOUX, J.-F.; PHAM-DELEĞUE, 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 dimethoate 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.
- BABCZYNSKA, A; WILCZEK, G.; MIGULA, P. Effects of dimethoate on spiders from metal pollution gradient. **The Science of the Total Environment**, v.370, p.352-359, 2006.
- BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L.P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase--a biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.246-53, 2008.
- BADIOU, A.; BRUNET, J.L.; BELZUNCES, L. Existence of Two Membrane-Bound Acetylcholinesterases in the Honey Bee Head. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.66, p.122-134, 2007.
- BADIOU-BENETEAU, A.; CARVALHO, S.M.; BRUNET, J.L.; CARVALHO, G.A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.82, p.22-31, 2012.
- BADIOU-BENETEAU, A.; BENNEVEAU, A.; GERET, F.; DELATTE, H.; BECKER, N.; BRUNET, J.L.; REYNAUD, B.; BELZUNCES, L.P. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. **Environment International**, v. 60, p.31-41, 2013.
- BARATA, C.; LEKUMBERRI, I.; VILA-ESCALE, M.; PRAT, N.; PORTE, C. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the trichoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). **Aquatic Toxicology**, v.74 p.3-19, 2005.
- BELZUNCES, L.P.; GAUTHIER, M.; COLIN, M-E. Acetylcholinesterase in *Apis mellifera* head during post-embryonic development. Existence of a glycoinositol-anchored membrane form at early pupal stages. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.103, p.57-63, 1992.
- BELZUNCES, L.P.; JEAN-JACQUES, L-R.; MICHEL, B. Properties of acetylcholinesterase from *Apis Mellifera* Heads. **Insect Biochemistry** 18(811):811-819, 1988.
- BICKER, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research and Technique**, v.45, p.174-183, 1999.
- BLACQUIERE, T.; SMAGGHE, G.; VANGESTEL, C.A.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v.21, p.973-92, 2012.

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

Chapman, R.F. **The insects: structure and function**. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

COUSIN, M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; KRETZSCHMAR, A.; EL MAATAOUI, M.; BRUNET, J.L.; BELZUNCES, L.P. Size changes in honey bee larvae oenocytes induced by exposure to Paraquat at very low concentrations. **PloS One**, v.8, e65693, 2013.

COUVILLON, M.J.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F.L.W. Waggle Dance Distances as Integrative Indicators of Seasonal Foraging Challenges. **PloS One**, v.9, e93495, 2014.

Cruz-Landim, C. **Morfologia e função de sistemas**. Editora Unesp, São Paulo, 2009.

DERECKA, K.; BLYTHE, M.J.; MALLA, S.; GENEREUX, D.P.; GUFFANTI, A.; PAVAN, P.; MOLES, A.; SNART, C.; RYDER, T.; ORTORI, C.A.; BARRETT, E.S.; STÖGER, R. Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. **PLoS One**, v.8, e68191, 2013.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-L. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.52, p. 81-106, 2007.

DIAO, Q.; YUAN, K; LIANG, P.; GAO, X. Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. **Journal Apicultural Research**, v.45, p.145-152, 2006.

ELSTON, C.; THOMPSON, H.M.; WALTERS, K.F.A. Sub-lethal effects of thiamethoxam, a neonicotinoid pesticide, and propiconazole, a DMI fungicide, on colony initiation in bumblebee (*Bombus terrestris*) micro-colonies. **Apidologie**, v.44, p.563-574, 2013.

GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B.E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics** v.68, p.810-821, 2009.

GILBERT, M.D, WILKINSON, C.F. Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.4, p.56-66, 1973

GILL RJ, RAMOS-RODRIGUEZ O, RAINE NE. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. **Nature**, v.491, p.105-108, 2012.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F.; AUPINEL, P.; et al. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v.336, p. 348-350, 2012.

JOHNSON, R.M. Honey bee toxicology. **Annual review of entomology**, v.60, p.415-34, 2014.

JOVANOVIC-GALOVIC, A.; BLAGOJEVIC, D.P.; GRUBOR-LAJISIC, G.; WORLAND, R.; SPASIC, M.B. Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): Diapause and metamorphosis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.55, p.79-89, 2004

KLEIN, A.M.; VAISSIERE, B.E.; CANE, J.H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; Cunningham, S.A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings Biological sciences / The Royal Society**, v.274, p.303-313, 2007.

KOSTAROPOULOS, I.; PAPADOPOULOS, A.I.; METAXAKIS, A.; BOUKOUVALA, E.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.313-319, 2001.

KREISSL, S.; BICKER, G. Histochemistry of Acetylcholinesterase and Immunocytochemistry of an Acetylcholine Receptor-Like Antigen in the Brain of the Honeybee. **The Journal of Comparative Neurology**, v.286, p.71-74, 1989.

KRUPKE, C.H.; HUNT, G.J.; EITZER, B.D.; ANDINO, G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PloS One**, v.7, e29268, 2012.

LAYCOCK, I.; COTTERELL, K.C.; O'SHEA-WHELLER, T.A.; CRESSWELL, J.E. Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.100, p.153-158, 2014.

LYCETT, G.J.; MCLAUGHLIN, L.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; KAFATOS, F.C.; LOUKERIS, T.G.; PAINE, M.J. Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. **Insect Molecular Biology**, v.15, p.321-327, 2006.

MAIENFISCH, P.; HUERLIMANN, H.; RINDLISBACHER, A.; GSELL, L.; DETTWILER, H.; HAETTENSCHWILER, J.; SIEGER, E.; WALTI, M. The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v.57, p.165-176, 2001.

MAXWELL, D.M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.114, p.306-312, 1992.

MICHELETTE, E.R.F.; SOARES, A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). **Apidologie**, v.24, p.431-440, 1993.

MOSS, D.W. Perspectives in alkaline phosphatase research. **Clinical Chemistry**, v. 38, p. 2486-2492, 1992.

MULLIN, C.A.; FRAZIER, M.F.; FRAZIER, J.L.F.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J.S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PloS One**, v. 5, e9754, 2010.

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

PILLING, E.; CAMPBELL, P.; COULSON, M.; RUDDLE, N.; TORNIER, I. A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. **PloS One**, v. 8, e77193, 2013.

RATNIEKS, F.L.W.; CARRECK, N.L. Clarity on Honey Bee Collapse? **Science**, v.327, p.152-153, 2010.

R Development Core Team. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>, 2013.

ROAT, T.C.; LANDIM, C.D.C. Mitosis and cell death in the optic lobes of workers, queens and drones of the honey bee (*Apis mellifera*) during metamorphosis. **Journal of Biosciences**, v.35, p.415-425, 2010.

RORTAIS, A.S.; ARNOLD, G.R.; HALM, M-P.; TOUFFET-BRIENS, F.D.R. 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.

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, e39114, 2012.

TAVARES, D.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. *In vitro* effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v.135, p.370-378, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. **Pest Management Science**, v. 57, 914-922, 2001.

YANG, E.C.; CHANG, H.C.; WU, W.Y.; CHEN, Y.W. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **PloS One**, v.7, e49472, 2012.

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

ZHU, W.; SCHMEHL, D.R.; MULLIN, C.A.; FRAZIER, J.L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PloS One**, v.9, e77547, 2014.

5 CAPÍTULO 3: PUPAS E OPERÁRIAS RECÉM-EMERGIDAS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADA TEM OS NÍVEIS DE SINAPSINA ALTERADOS APÓS A EXPOSIÇÃO SUBLETAL AO TIAMETOXAM NA FASE LARVAL

Daiana Antonia Tavares¹, Thaisa Cristina Roat¹, Elaine Cristina Matias Silva-Zacarin², Osmar Malaspina¹

¹ Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de abelhas (LECA) – Centro de estudos de insetos sociais (CEIS) – Departamento de biologia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”(UNESP), Rio Claro, São Paulo.

² Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) – Departamento de Biologia – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Sorocaba, São Paulo.

RESUMO

O tiametoxam é um inseticida neurotóxico amplamente utilizado para o controle de insetos-praga, podendo, no entanto, afetar indiretamente insetos não alvos, como é o caso da abelha *Apis mellifera* africanizada. Pertencente à classe dos neonicotinoides, este inseticida atua como agonista junto aos receptores de nicotina e acetilcolina, presentes ao longo do sistema nervoso dos insetos, especialmente no cérebro, ligando-se irreversivelmente, alterando desta forma, os padrões das transmissões nervosas, e conduzindo o inseto à morte por excitação seguida de paralisia. Por ser este inseticida, apontado como um dos responsáveis pelo desaparecimento das abelhas, e levando em consideração a importância de *A. mellifera* africanizada no contexto econômico e ecológico, este estudo teve como objetivo avaliar a neurotoxicidade do tiametoxam através da marcação imunocitoquímica da proteína sinapsina no cérebro de pupas e recém-emergidas de *A. mellifera* após a exposição a três concentrações subletais do inseticida tiametoxam durante a fase larval. Os resultados revelaram que houve imunomarcação da sinapsina em todas as regiões do cérebro analisadas. Diferenças foram observadas nos corpos pedunculados e lobos antenais do grupo controle de pupas e recém-emergidas quando comparados com os grupos expostos a 0,001 e 1,44 ng/μL no caso das pupas, e a 1,44 ng/μL no caso das recém-emergidas. Nossos resultados demonstram que a exposição durante o estágio larval de *A. mellifera* a concentrações subletais do tiametoxam, pode alterar os níveis de sinapsina durante o desenvolvimento de *A. mellifera*, e causar consequentes prejuízos das funções nervosas, podendo inviabilizar a sobrevivência do inseto adulto.

Palavras-chave: Sinapses. Cérebro. Imunocitoquímica. Desenvolvimento. Toxicologia.

5.1 INTRODUÇÃO

O inseticida tiametoxam, pertencente à classe dos neonicotinoides, é amplamente utilizado em várias culturas agrícolas, contra diferentes tipos de insetos-praga. Este inseticida atua como agonista, nos receptores nicotínicos de acetilcolina, presentes no sistema nervoso dos insetos, nas membranas pós-sinápticas. Desta forma, ele mimetiza o neurotransmissor natural, a acetilcolina, ligando-se de forma irreversível e ocasionando a morte do inseto por excitação, seguida de paralisia em poucos minutos (MAIENFISCH et al., 2001; MATSUDA et al., 2001; TOMIZAWA; CASIDA, 2003). Por apresentar tais características, este inseticida pode afetar também, insetos não alvos, como é o caso de *A. mellifera*.

Desde que os neonicotinoides foram introduzidos no mercado, iniciaram relatos de apicultores acerca do possível sumiço das abelhas, eventos tais como, desorientação, não retorno para as colônias, perda massiva das colônias foram identificados. Essas observações foram primeiramente identificadas nos Estados Unidos, recebendo o nome de “Colony Collapse Disorder”, desordem e colapso das colônias (CCD) (STOKSTAD, 2007; VANELGELSDROP et al., 2009).

Desde então, houve uma crescente preocupação, uma vez que *Apis mellifera* é um inseto chave para a polinização e conseqüentemente para reprodução dos ecossistemas naturais, e das culturas agrícolas. Além disso, esta espécie tem destaque na economia mundial, através da comercialização dos produtos e subprodutos provenientes da colônia, dentre eles, o mel, a própolis, a geleia real e a cera (DEVILLERS, 2002; POTTS et al., 2010).

Atualmente, sabe-se, que o desaparecimento das abelhas, possivelmente tenha causas multifatoriais, uma vez que, diversos fatores externos podem comprometer a sobrevivência das abelhas, tais como, redução dos recursos florais, ocasionados pela perda dos habitat naturais, infecção por vírus e parasitas como também a exposição a coquetéis de agroquímicos, dentre eles os neonicotinoides (GOULSON et al., 2015).

Por serem neurotóxicos, diversas pesquisas tem correlacionado a exposição subletal das abelhas aos neonicotinoides, com diferentes tipos de alterações comportamentais, tais como, alterações nas atividades de forrageamento, no aprendizado olfatório, como também, surpreendentemente na preferência alimentar por fontes de açúcar que contenham tais pesticidas (DECOURTYE et al., 2004; FISHER et al., 2014; HENRY et al., 2012; KESSLER et al., 2015).

Embora, diferentes tipos de estudos dos efeitos dos inseticidas sobre *A. mellifera* tenham sido reportados, poucas buscas tem sido realizadas no que diz respeito às implicações

de contaminações durante o desenvolvimento pós-embrionário como também suas consequências para as operárias recém-emergidas (BLACQUIÈRE et al., 2012; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007). Sabe-se que o risco de contaminação larval com neonicotinoides, pode ocorrer através do pólen, néctar como também da cera contaminados, e que possivelmente podem entrar em contato com as larvas via alimentação ou via contato da superfície do tegumento (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

Sendo o cérebro, uma estrutura responsável pela minuciosa e correta coordenação das atividades neurofisiológicas, que irão refletir também, em todas as atividades motoras das abelhas, presume-se que danos ocasionados pelos neonicotinoides neste órgão, podem ocasionar em alterações em sua neurofisiologia, possivelmente refletindo na sobrevivência destes insetos. Embora não se saiba com exatidão, quais são as consequências que alterações no cérebro podem provocar nas abelhas, doses subletais de neonicotinoides são responsáveis por causar mortes celulares atípicas nos lobos ópticos e corpos pedunculados do cérebro de *A. mellifera* (ROSSI, et al., 2013 OLIVEIRA et al., 2012) como também nos lobos ópticos de larvas desta espécie (TAVARES et al., 2015).

Corpos pedunculados (Cps), lobos antenais (Las) e lobos ópticos, são estruturas cerebrais, fundamentais para a assimilação e processamento das informações no cérebro das abelhas. Pelo fato dessas estruturas possuírem regiões de prolongamentos de neurônios, elas são responsáveis também pela rápida transmissão dos impulsos nervosos através das sinapses nervosas (ABEL; RYBAK; MENZEL, 2001; MENZEL, 2012). Assim, este estudo teve como objetivo, avaliar os efeitos de concentrações subletais do inseticida tiametoxam, sobre os níveis de sinapsina, proteína envolvida na liberação de neurotransmissores durante as sinapses nervosas, de pupas e operárias recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, que foram previamente expostas de forma oral aguda na fase larval.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Procedimentos experimentais

Foram selecionadas três colônias de *A. mellifera* africanizada pertencentes ao apiário do Instituto de Biociências da Unesp, campus Rio Claro, que se encontravam saudáveis e em condições ideais para a coleta. 3 dias antes do experimento, quadros limpos foram colocados no interior das colônias e a rainha isolada em uma caixa excludora, para a realização da oviposição. No dia 4 (d-4), larvas de 1º instar foram transferidas com o auxílio de uma espátula de coleta estéril em inox, para cúpulas plásticas. Antes da transferência, e de acordo com metodologia de Aupinel et al. (2005); (2007) adotada pela OECD (2013), as cúpulas foram desinfetadas em solução de dicloroisocianurato de sódio 0,4% durante 30 minutos. Na sequência, as cúpulas foram devidamente secas em estufa *overnight* e no dia seguinte, colocadas em uma caixa com luz U.V. durante 30 minutos. Após isso, as cúpulas foram organizadas em placas de cultura celular de 48 poços, estéreis, que continham em seu interior ¼ de algodão dental embebidos em 500 µL de solução de glicerol 15% e dicloroisocianurato de sódio 0,4%. Do d-1 ao d-7, as placas contendo as larvas, foram armazenadas em caixas plásticas com tampa e travas laterais, que foram arranjadas dentro de uma estufa do tipo B.O.D. temperatura 34° C, e umidade relativa de 93% UR ± 95% UR, que foi mantida através de solução de K₂SO₄ 140 g/L, contida em pequenos béqueres no interior da caixa. Durante o período de pupação, do d-7 ao 15-d, a temperatura foi mantida, e a umidade foi alterada para 80% UR, de acordo com as exigências do inseto nesta fase de desenvolvimento. Para isto, a solução de K₂SO₄ foi substituída por NaCL 400 g/L, para auxiliar na redução da umidade, além disso, durante este período não foi fornecido dieta. No 15-d, a fim de simular as condições da colônia, e de obter condições ideais para a emergência das abelhas, as placas foram individualmente arranjadas em potes plásticos individuais e na posição vertical, com o auxílio de fita adesiva. Os potes foram acondicionados diretamente em estufa B.O.D, com 50% UR, e após a organização das placas, foi adicionado cândi (50% mel e 50% açúcar) e água.

5.2.2 Composições das dietas larvais

Para a alimentação larval, as dietas foram preparadas com 50% de geleia real adquirida de Lambertucci®, e 50% de solução açucarada em diferentes proporções de acordo com a metodologia adotada, sendo elas, 12% de glicose e frutose, 2% de extrato de levedura (dieta A), 15% de glicose e frutose, 3% de extrato de levedura (dieta B) e por último 18% de glicose e frutose, 4% de extrato de levedura (dieta C). As larvas foram alimentadas do d-1 ao

dia d-6, com exceção do d-2, considerado período de aclimação larval, nas seguintes proporções: d-1 20 μL de dieta A, d-3 20 μL de dieta B, e d-4, d-5 e d-6 30, 40 e 50 μL respectivamente de dieta C. Os açúcares e o extrato de levedura foram adquiridos de Sigma-Aldrich.

5.2.3 Exposição aguda de larvas de *Apis mellifera* africanizada ao tiametoxam

Para nossas investigações, foram selecionadas três concentrações subletais do tiametoxam, sendo elas: 0,00001; 0,001 e 1,44 ng/ μL de alimento. As concentrações de trabalho foram adotadas, baseadas em estudos previamente realizados. No caso das duas primeiras, correspondem ao que aproximadamente, é encontrado no pólen e néctar (MULLIN et al., 2010; STONER e EITZER., 2012; PILLING et al., 2013; KRUPKE et al., 2014) ver Tabela 1, e no caso da terceira, a concentração corresponde a 1/10 da CL_{50} , previamente estabelecida para *A. mellifera* africanizada (TAVARES et al., 2015). O tiametoxam foi adquirido de Cluzeau Info-Labo (99,6% de pureza), e adicionado diretamente no alimento larval, a partir de soluções estoque concentradas (3x) e previamente preparadas em água destilada, obtendo assim 0,00001; 0,001 e 1,44 ng/ μL em dieta C. O grupo controle recebeu somente dieta C não contaminada. As larvas dos grupos expostos foram contaminadas no d-4 com tiametoxam através de 30 μL de dieta C, sendo assim, receberam um total de 0,0003; 0,03; e 43,2 ng/ μL (doses nominais). Para cada grupo experimental, como também para o grupo controle, foram feitas réplicas de 48 larvas, sendo o experimento realizado em triplicata, totalizando 144 larvas para cada grupo. O consumo do alimento após a contaminação foi cuidadosamente averiguado. As mortalidades foram checadas ao longo de todo o experimento, sendo que, durante a fase larval, foi utilizado esteriomicroscópio EZ4 (Leica) para averiguar as mortalidades larvais.

5.2.4 Procedimentos neuroanatômicos, imunofluorescência e marcação nuclear

Após a exposição aguda das larvas de *A. mellifera* africanizada, foram coletadas 3 pupas no d-15 (pupas de olhos preto e corpo não pigmentado) e 3 operárias recém-emergidas no d-19 de cada concentração, como também do grupo controle de acordo com a classificação de Michellete e Soares (1993); Cruz-Landim (2009). O cérebro das pupas e recém-emergidas foram dissecados em placas de Petri contendo solução fixadora de paraformaldeído 4% sob estereomicroscópio EZ4 (Leica). Os órgãos foram colocados na mesma solução fixadora por 2h, e posteriormente lavados em PBS (tampão fosfato salino pH 7.4) três vezes por 10 min

cada, e armazenados a 4°C para posterior inclusão. Foram obtidos cortes frontais dos cérebros, através da embebição destes em 5% de agarose, (agarose II™, 0815-25G Amresco), e secção em vibrátomo Leica TCS-SP5II, 100 µm de espessura. Para a marcação da sinapsina, os cortes foram permeabilizados com uma solução de PBS pH 7.4 contendo 2% de Normal Goat Serum (NGS) e Triton 0,2% temperatura ambiente durante 1h. Os cortes foram então lavados duas vezes em PBS e incubados durante 5 dias, ausência de luz e a 4° C, no anticorpo monoclonal contra a proteína associada a vesícula sináptica de *Drosophila*, sinapsina 1 (1:50; SYNORF1), diluído em PBS pH 7.4. O anticorpo SYNORF1 foi obtido do Developmental Studies Hybridoma Bank, mantido pela Universidade de Iowa. Após a incubação o material foi lavado por três vezes em PBS, e incubado em anticorpo secundário Cy5 cabra anti-rato (1:100 em PBS pH 7.4; Molecular Probes) durante 1 hora. As secções foram lavadas por três vezes em PBS, incubadas por 10 min com DAPI (4', 6'-diamino-2-fenilindol 1:500) para a marcação imunofluorescente dos núcleos, e finalmente as secções foram lavadas três vezes em PBS montadas utilizando o Prolong® Gold Antifade como meio de montagem. Com o objetivo de comprovar a marcação da sinapsina, foram feitos dois controles negativos da reação, utilizando os mesmos procedimentos acima descritos, salvo, que no caso do primeiro controle, o material não foi incubado com anticorpo secundário, e o segundo controle o material não foi incubado em ambos os anticorpos, primário e secundário.

5.2.5 Microscopia confocal por escaneamento a laser, processamento das imagens e análises dos dados

As preparações foram visualizadas em microscópio confocal de varredura a Laser Leica TCS - SP5 equipado com laser de argônio e filtro HFT utilizando o laser 633nm para a excitação do Cy5, e o 405nm para excitação do DAPI. Foram feitas secções ópticas dos (Cps), (Las) e (Los) de pupas e adultos, com profundidade de 15µm e intervalo de 1µm em objetivas de 40x para (Cps e Las) e 20x para (Los). Para o processamento e quantificação da sinapsina, foi utilizado o software Leica Application Suite AF 2.6.0.. Para a quantificação, foram utilizadas 6 áreas de medição para os (Cps) com 53 x 52 µm (largura x altura) cada, 3 áreas em cada cálice, na extremidade superior, mediana e inferior. Para os (Las), foram utilizadas 7 áreas de medição com 58 x 52 µm cada ao redor de toda a extensão da estrutura, e finalmente, para os (Los), foram utilizadas 5 áreas de medição com 156 x 158 µm na extensão da região da medula. As análises estatísticas foram efetuadas utilizando o programa SigmaPlot 11.0, (Systat), sendo que, para a comparação das médias dos grupos, foi efetuada

análise de variância ANOVA one way. Para identificar as diferenças significativas entre os grupo controle e os grupos expostos, foi utilizado o teste de Holm-Sidak com nível de significância fixado em $p < 0,05$.

5.3 RESULTADOS

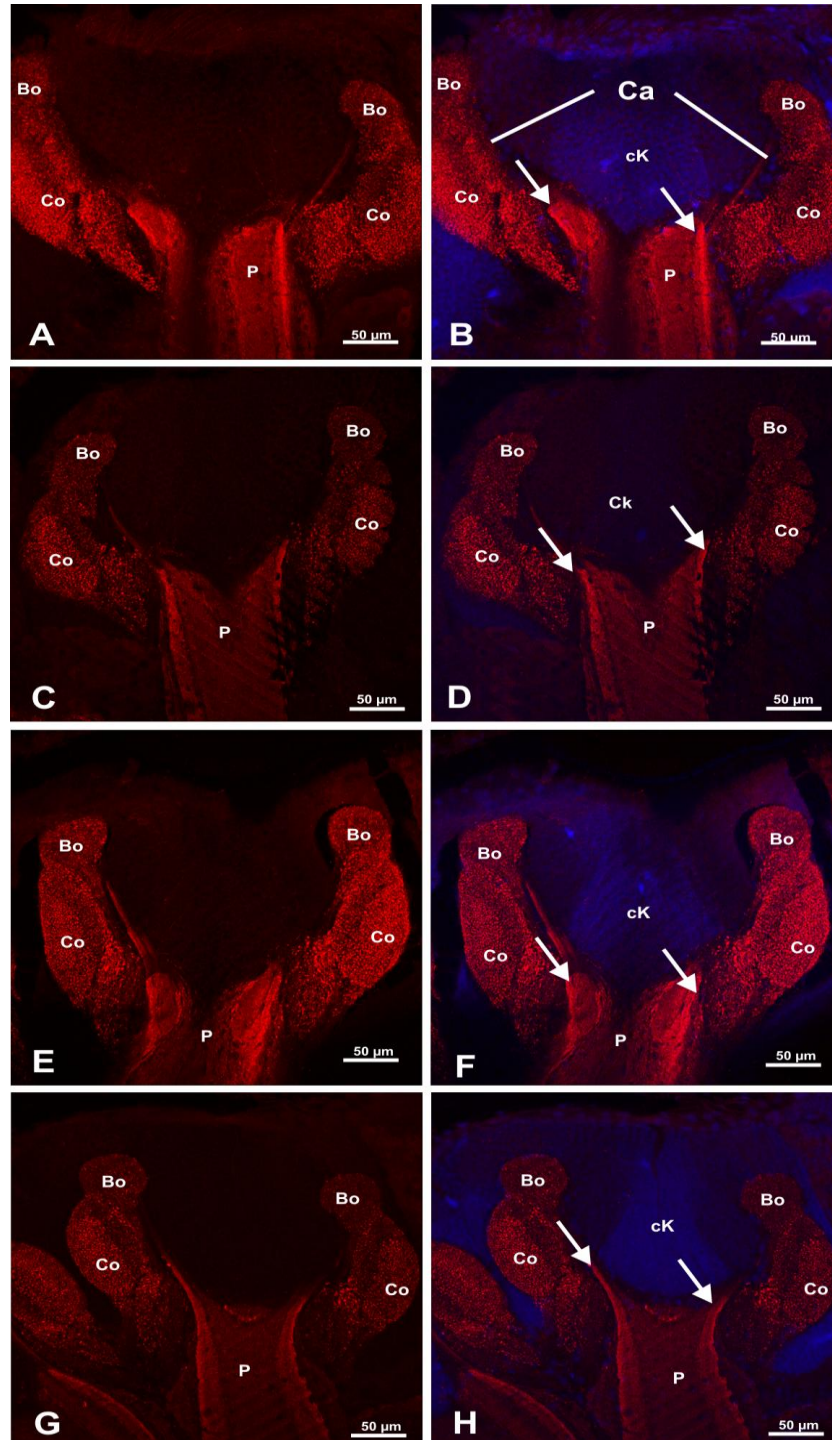
Ao longo do desenvolvimento de *A. mellifera* africanizada em condições laboratoriais, após a contaminação larval, não foram verificadas diferenças na mortalidade entre o grupo controle e os grupos expostos, para esta subespécie. Além disso, as porcentagens de pupação e emergência foram similares em todos os grupos, demonstrando a correta seleção das concentrações subletais de trabalho, como também a viabilização das coletas de indivíduos em boas condições para as análises da sinapsina.

A partir das imagens obtidas, foi possível observar nos (Cps) de pupas e recém-emergidas, a marcação da proteína sinapsina ao longo de toda região do cálice, como também uma forte marcação na região do pedúnculo em todos os grupos de acordo com a Figura 1A. Nos (Las), as marcações foram evidentes, e localizadas nos glomérulos ao longo de toda estrutura, conforme evidencia a Figura 2, e finalmente nos (Los) foi possível visualizar marcação da sinapsina ao longo da lóbula e medula, apresentando duas faixas intensamente marcadas nesta última região conforme Figura 3.

Através das análises das médias obtidas pela quantificação, da proteína sinapsina nos cérebros de pupas e recém-emergidas de *A. mellifera* africaniza, foi possível verificar uma diminuição significativa desta proteína nos (Cps) conforme Figura 4, e nos (Las) conforme Figura 5, sobre tudo, na concentração de 1,44 ng/ μ L de dieta. Nos (Cps), diferenças significativas foram denotadas em pupas ($p=0,042$; ANOVA one way) e recém-emergidas ($p=0,005$; ANOVA one way) quando comparadas com o controle. Além desta concentração, no caso dos (Cps) das pupas, diferença significativa foi observada na concentração de 0,001 ng/ μ L ($p=0,029$; ANOVA one way). Nos (Las) de pupas e recém-emergidas foram observadas diferenças entre o grupo controle e a concentração de 1,44 ng/ μ L ($p=0,015$; ANOVA one way) e ($p=0,048$) respectivamente. Nos (Los) não foram observadas diferenças quando se comparou os grupos expostos com o controle ($p>0,05$; ANOVA one way).

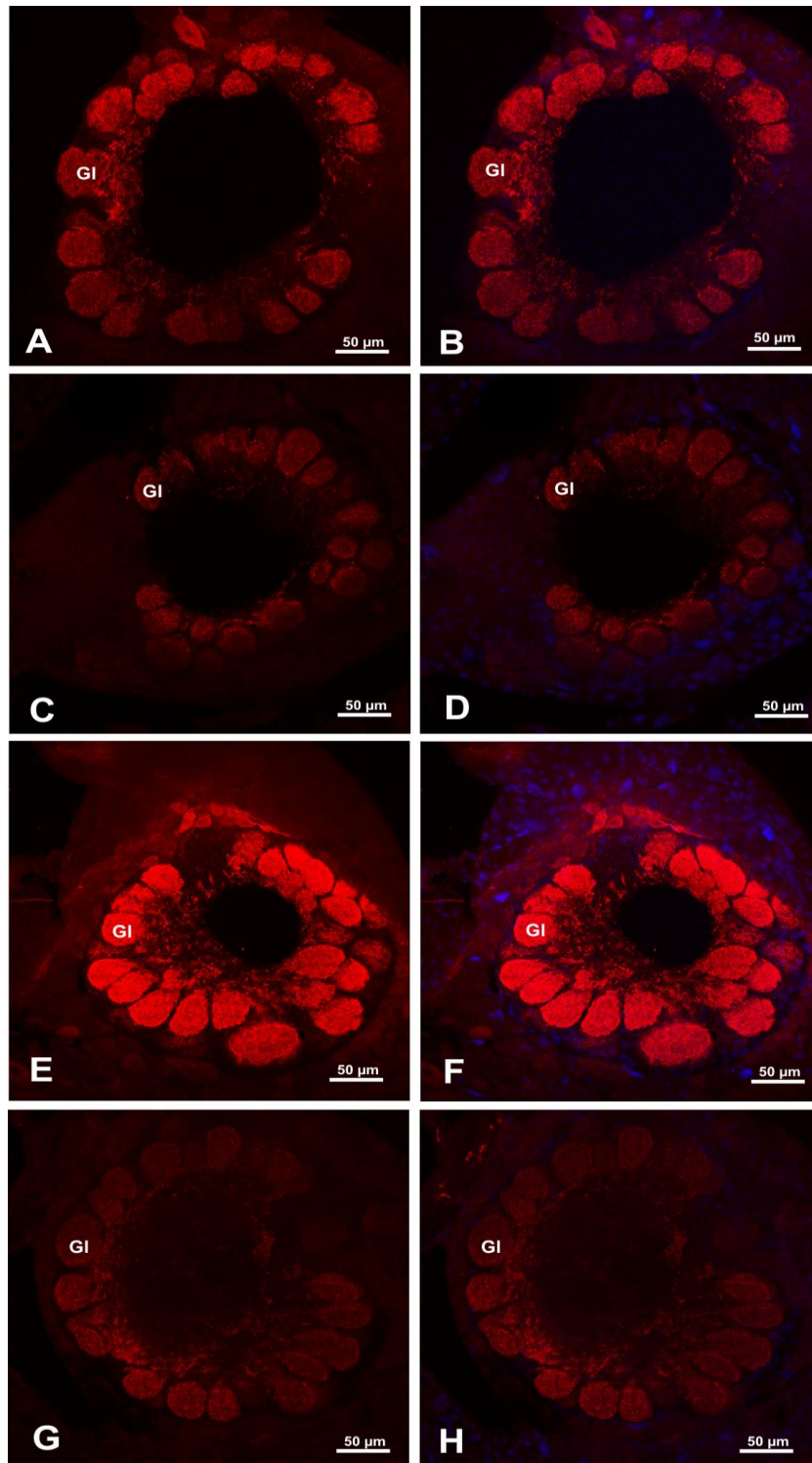
5.3.1 Figuras e tabelas

Figura 1 – Imunomarcção da sinapsina nos corpos pedunculados de pupas e recém-emergidas de *Apis mellifera* africanizada.



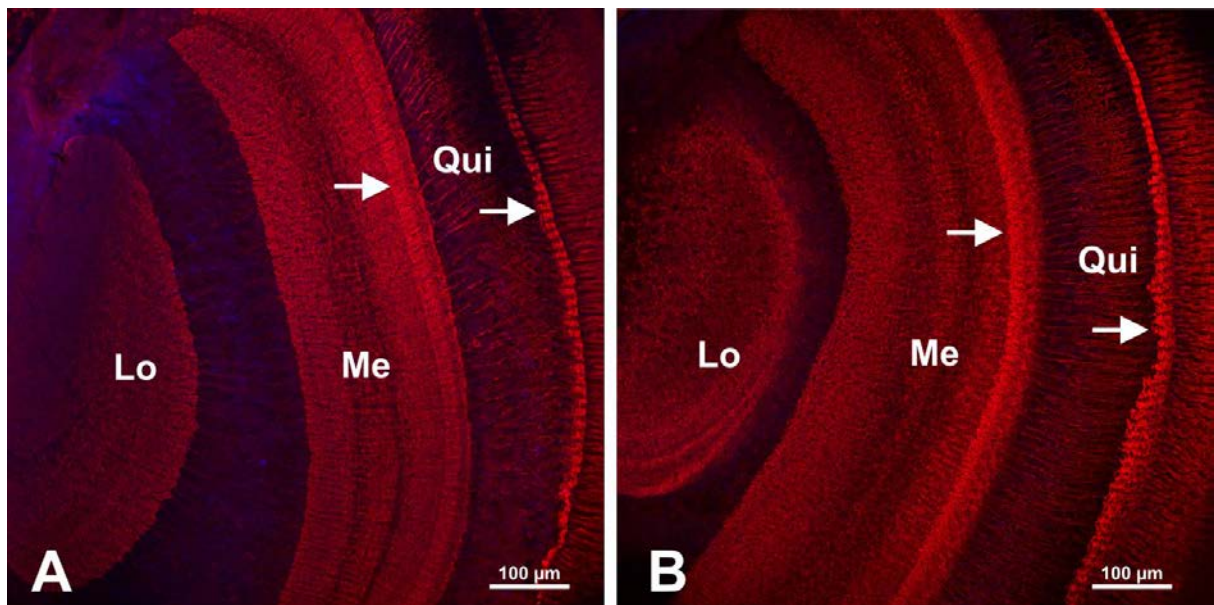
Imagens de microscopia confocal com a sinapsina, em vermelho (anti-synorfl e Cy5), e núcleos em azul (DAPI). A e B, corpos pedunculados de pupas do grupo controle. C e D, corpos pedunculados de pupas previamente expostas à 0,001 ng/μL do inseticida tiametoxam. E e F, corpos pedunculados de recém-emergidas do grupo controle. G e H, corpos pedunculados de recém-emergidas previamente expostas a 1,44 ng/μL de tiametoxam. As setas demonstram a intensa imunomarcção no pedúnculo. Bo, borda; Co, collar; Ca, cálices; P, pedúnculo; Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 2 – Imunomarcação da sinapsina nos lobos antenais de pupas e recém-emergidas de *Apis mellifera* africanizada.



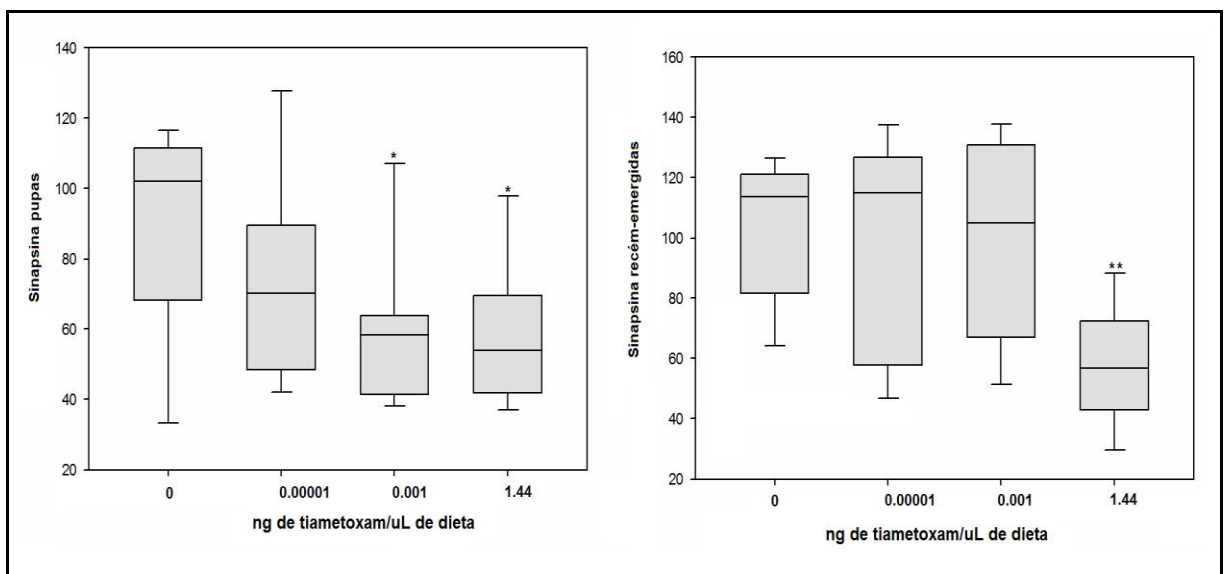
Imagens de microscopia confocal com a sinapsina, em vermelho (anti-synorfl e Cy5), e núcleos em azul (DAPI). A e B, lobos antenais de pupas do grupo controle. C e D, lobos antenais de pupas previamente expostas à 1,44 ng/μL do inseticida tiametoxam. E e F, lobos antenais de recém-emergidas do grupo controle. G e H, lobos antenais de recém-emergidas previamente expostas a 1,44 ng/μL de tiametoxam. Gl, glomérulo. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 3 – Imunomarcção da sinapsina nos lobos antenais de pupas e recém-emergidas de *Apis mellifera* africanizada.



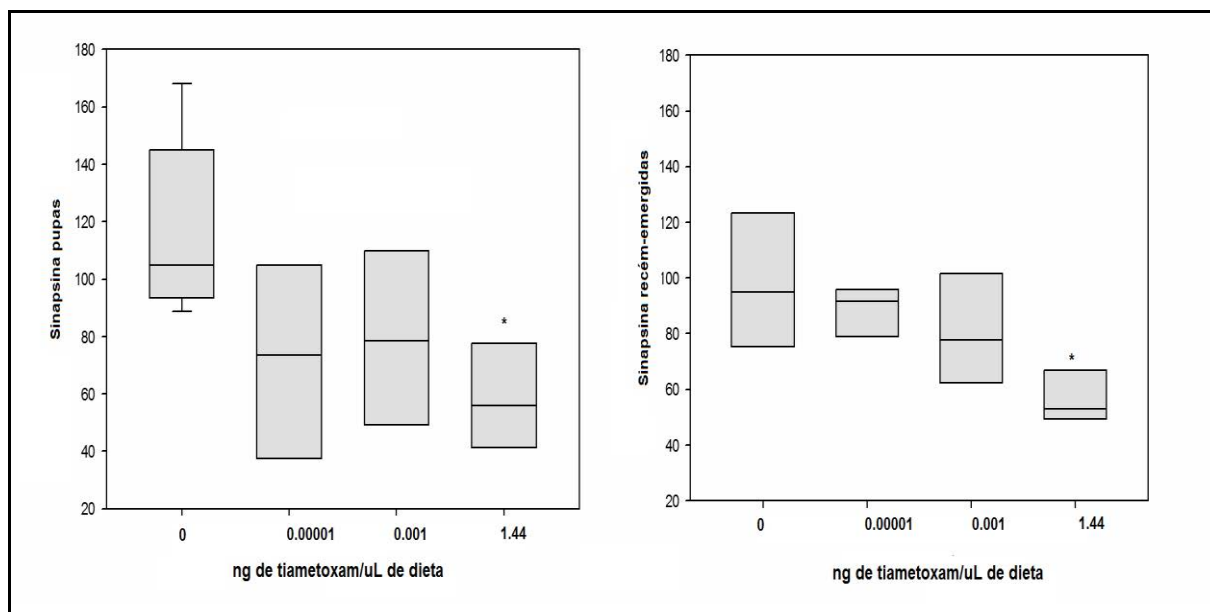
Imagens de microscopia confocal com a sinapsina, em vermelho (anti-synorfl e Cy5), e núcleos em azul (DAPI). A e B, lobos ópticos de recém-emergidas do grupo controle. As setas indicam intensa imunomarcção na região da medula. Lo, lóbula; Me, medula; Qui, quiasma. Fonte: Desenvolvido pelo autor.

Figura 4 – Boxplot das médias obtidas pelas análises da marcação da sinapsina nos corpos pedunculados de pupas e recém-emergidas de *Apis mellifera*.



Análises ANOVA one way com base nas médias obtidas da intensidade de laser emitida para a marcação da sinapsina nos corpos pedunculados de pupas e recém-emergidas respectivamente, previamente expostas ao insetida tiametoxam. Box plots mostram as medianas como também a variação das médias obtidas nas análises. Diferenças significativas são denotadas (*) através da comparação dos grupos expostos com o grupo controle. Fonte: Desenvolvido pelo autor

Figura 5 – Boxplot das médias obtidas pelas análises da marcação da sinapsina nos lobos antenais de pupas e recém-emergidas de *Apis mellifera*.



Análises ANOVA one way com base nas médias obtidas da intensidade de laser emitida para a marcação da sinapsina nos lobos antenais de pupas e recém-emergidas respectivamente, previamente expostas ao insetida tiametoxam. Box plots mostram as medianas como também a variação das médias obtidas nas análises. Diferenças significativas são denotadas (*) através da comparação dos grupos expostos com o grupo controle.

Fonte: Desenvolvido pelo autor

Tabela 1 – Concentrações de tiametoxam reportados no pólen e néctar floral.

Thiametoxam (ppb)		Referências
Pólen	Néctar	
53.3	-	MULLIN et al., 2010
12	11	STONER; EITZER, 2012
7,3	-	KRUPKE et al., 2012
7	2.4	PILLING et al., 2013

Fonte: Elaborada pelos autores com base nas referências bibliográficas.

3.4 DISCUSSÃO

Efeitos subletais dos neonicotinoides, durante o desenvolvimento pós-embrionário das abelhas permanecem pouco explorados, apesar de haver uma intrínseca relação entre o correto desenvolvimento com a viabilidade e sobrevivência da colônia (BLACQUIÈRE et al., 2012). Este estudo mostra a neurotoxicidade de concentrações subletais do inseticida tiametoxam para pupas e recém-emergidas de *A. mellifera* africanizada, após a exposição durante a fase larval, através da redução da imunomarcção da sinapsina, nos Cps e Las.

Essas duas estruturas cerebrais de *A. mellifera*, são conhecidas pela importância neurofisiológica que exercem, Cps por estarem relacionados ao aprendizado, formação e consolidação da memória, e Las, por possibilitar o reconhecimento e aprendizado olfatório, funções estas, que são vitais para a sobrevivência das abelhas (HOURCADE et al., 2010; MENZEL, 1990). Durante o processamento olfatório de *A. mellifera* por exemplo, os Las e Cps trabalham de forma integrada, resultando em diferentes respostas comportamentais destes insetos, como por exemplo, na localização de fontes de alimento (MENZEL, 1990; SANDOZ, 2011).

Assim, a exposição larval de *A. mellifera* africanizada, às concentrações de 0,001 e 1,44 ng/ μ L de tiametoxam, podem ocasionar distúrbios neurofisiológicos de pupas, nas duas concentrações, e em recém-emergidas na concentração de 1,44 ng/ μ L, uma vez que as funções destas duas estruturas cerebrais podem ficar prejudicadas, através da redução da proteína sinapsina. Especial atenção deve ser dada a concentração de 0,001 ng/ μ L, uma vez que esta se encontra dentro dos níveis de tiametoxam que atualmente são detectados no néctar, cera e também no pólen que é incorporado na dieta larval (BABENDREIER et al., 2004; KRUPKE et al., 2012; MULLIN et al., 2010; PILLING et al., 2013; STONER e EITZER, 2012).

Sinapsinas são conhecidas como uma pequena família de fosfoproteínas que possuem as funções de regular a disponibilidade de vesículas sinápticas para exocitose, e regular a liberação de neurotransmissores participando assim das sinapses nervosas (HILFIKER et al., 1999; KLAGGES et al., 1996). Apesar de não serem elementos essenciais para que a transmissão sináptica ocorra, delas, depende o ajuste fino da formação, plasticidade e remodelação das sinapses (BENFENATI, 2011; HUMEAU et al., 2011). Uma vez que o anticorpo anti-sinapsina por nós utilizado, marca a sinapsina associada às vesículas sinápticas (GROH et al., 2014; KLEGGES et al., 1996) presume-se que o tiametoxam acarretou o decréscimo dessa proteína associada a vesícula sináptica, o pode prejudicar as sinapses

nervosas, através do comprometimento de suas funções de regulação da disponibilidade das vesículas sinápticas, e da liberação de neurotransmissores.

A imunomarcagem da sinapsina foi previamente realizada por Groh, Tautz e Rossler (2003) com o objetivo de verificar se a temperatura no interior do ninho poderia influenciar na organização sináptica de abelhas adultas da espécie *A. mellifera*, mostra a importância deste tipo de estudo, para identificar diferenças na imunomarcagem desta proteína entre organismos sujeitos a condições diferentes.

Em relação aos inseticidas, são escassas investigações acerca dos possíveis efeitos neurotóxicos para abelhas, através da imunomarcagem da sinapsina. Recentemente, Cintra-Socolowski et al. (2015) verificaram alterações na imunomarcagem da sinapsina nos Cps de formigas da espécie *Attas sexdens* após 24h da exposição ao inseticida fipronil. Embora não tenham estudado a marcação da sinapsina, para suas avaliações, Yang et al. (2012) concluíram, através da investigação dos efeitos subletais do inseticida imidacloprido sobre *A. mellifera*, que a exposição do ninho ao inseticida, pode conduzir a uma redução na aprendizagem olfatória dos indivíduos adultos, demonstrando a consequência da exposição ao imidacloprido no comportamento das abelhas adultas.

Embora tenhamos visto que a exposição durante a fase larval tenha ocasionado efeitos tardios em pupas e recém-emergidas, é difícil apontar quais são os mecanismos que possam causar a diminuição da sinapsina nas estruturas analisadas. Sabe-se que, a associação da sinapsina às vesículas sinápticas, se dá através da desfosforilação desta proteína, e quando há a liberação de cálcio há a fosforilação da sinapsina, com consequente mobilização das vesículas sinápticas para o ciclo exocítico (DIEGELMANN et al., 2013; HILFIKER et al., 1999).

Assim, é possível presumir, baseados ao fato de que o cérebro de *A. mellifera* possui mecanismos minuciosos de processamento e integração das informações, que as alterações aqui observadas, podem contribuir negativamente para a sobrevivência do inseto adulto, através de alterações neurofisiológicas que podem refletir no comportamento das abelhas, o que consequentemente dificultaria a sobrevivência da colônia, que é assegurada pela complexidade de relações existentes na sua forma de organização.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP, processos: 2012/01498-0 e 2012/50197-2, ao Antonio Sérgio Pascon pelo suporte na coleta das larvas, e ao Centro de Microscopia Eletrônica, CME da Unesp, campus Botucatu, pelos serviços prestados.

REFERÊNCIAS

- ABEL, R.; RYBAK, J.; MENZEL, R. Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 437, p.363-383, 2001.
- 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, 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, 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, p.293-300, 2004.
- BENFENATI, F. Synapsins – Molecular function, development and disease. **Seminars in Cell & Development Biology**, v.22, p.377, 2011.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; van GESTEL, A.M.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v.21, p.973-972, 2012.
- BOILY, M.; SARRASIN, B.; CHRISTIAN, D.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, v.20, p.5603-5614, 2013.
- CINTRA-SOLOWISKI, P.; ROAT, T.C.; NOCELLI, R.C.F.; NUNES, P.H.; FERREIRA, R.A.C.; MALASPINA, O.; BUENO, O.C. Sublethal doses of fipronil intensify synapsin immunostaining in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) brains. **Pest Management Science**, doi:10.1002/ps.4065, 2015.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo, Editora Unesp, 2009.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, S.; CHARRETON, M.; PHAM-DELÈGUE, M.-H. Effects of imidaclopid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p.410-419, 2004.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-L. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.52, p. 81-106, 2007.
- DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: DEVILLERS, J. & PHAM-DELÈGUE, M.-H., **Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals**, Taylor & Francis: London, p.56-66, 2002.

DIEGELMANN, S.; KLAGGES, B.; MICHELS, B.; SCHLEYER, M.; GERBER, B. Maggot learning and synapsin function. **The Journal of Experimental Biology**, v.216, p.939-951, 2013.

FISCHER, J.; MÜLLER, T.; SPATZ, A.-K.; GREGGERS, U.; GRÜNEWALD, B.; MENZEL, R. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. **PLoS One** v.9, e91364, 2014.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v.347, p.6229, 2015.

GROH, C.; KELBER, C.; GRÜBEL, K.; RÖSSLER, W. Density of mushroom body synaptic complexes limits intraspecies brain miniaturization in highly polymorphic leaf-cutting ant workers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.281, p.1-9, 2014.

GROH, C.; TAUTZ, J.; RÖSSLER, W. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. **PNAS**, v.101, p.4268-4273, 2004.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F.; AUPINEL, P.; et al. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v.336, p. 348-350, 2012.

HILFIKER, S.; PIERIBONE, V.A.; CZERNIK, A.J.; KAO, H.-T.; AUGUSTINE, G.J.; GREENGARD, P. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. **The Royal Society**, v.354, p.269-279, 1999.

HOURLCADE, B.; MUENZ, T.S.; SANDOZ, J.-C.; RÖSSLER, W.; DEVAUD, J.-M. Long-Term Memory Leads to Synaptic Reorganization in the Mushroom Bodies: A Memory Trace in the Insect Brain? **The Journal of Neuroscience**, v.30, p.6461-6465, 2010.

HUMEAU, Y.; CANDIANI, S.; GHIRARDI, M.; POULAIN, B.; MONTAROLO, P. Functional roles of synapsins: Lessons from invertebrates. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.22, p. 425-433, 2011.

KESSLER, S.C.; TIEDEKEN, E.J.; SIMCOCK, K.L.; DERVEAU, S.; MITCHELL, J.; SOFTLEY, S.; STOUT, J.A.; WRIGHT, G. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature Letter**, doi: 10.1038/nature14414, 2015.

KLAGGES, B.R.E.; HEIMBECK, G.; GODENSCHWEGE, T.A.; HOFBAUER, A.; PFLUGFELDER, G.O.; REIFEGERSTE, R.; REISCH, D.; SCHAUPP, M.; BUCHNER, S.; BUCHNER, E. Invertebrate Synapsins: A Single Gene Codes for Several Isoforms in *Drosophila*. **The Journal of Neuroscience**, v.16, 3154-3165, 1996.

KRUPKE, C.H.; HUNT, G.J.; EITZER, B.D.; ANDINO, G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PloS One**, v.7, e29268, 2012.

MAIENFISCH, P.; ANGST, M.; BRANDL, F.; FISCHER, W.; HOFER, D.; KAYSER, H.; KOBEL, W.; RINDLISBACHER, A.; SENN, R.; STEINEMANN, R.; WIDMER,

S.CHEMISTRY and biology of thiametoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v.77, p.906-13, 2001.

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM, S.D.; KLEIER, D.; RAUH, J.J.; GRAUSO, M.; SATTELLE, D.B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in pharmacological Sciences**, v.11, p.573-580, 2001.

MENZEL, R. **Learning, memory and “cognition” in honey bees**. In: Kesner RP, Olten DS, editors. *Neurobiology of comparative cognition*. Hillsdale, NJ: Erlbaum Inc. p 237–292, 1990.

MENZEL, R. The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. **Nature**, v.13, p.758-768, 2012.

MICHELETTE, E.R.F.; SOARES, A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). **Apidologie**, v.24, p.431-440, 1993.

MULLIN, C.A.; FRAZIER, M.F.; FRAZIER, J.L.F.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J.S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PloS One**, v. 5, e9754, 2010.

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

OLIVEIRA, R.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, p.1122-1133, 2012.

PILLING, E.; CAMPBELL, P.; COULSON, M.; RUDDLE, N.; TORNIER, I. A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. **PloS One**, v. 8, e77193, 2013.

POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v.25, p.345-53, 2010.

ROSSI, C.A.; ROAT, T.C.; TAVARES, D.A.; CINTRA-SOCELOWSKI, P.; MALASPINA, O. Brain morphophysiology of africanized bee *Apis mellifera* Exposed to sublethal doses of imidacloprid. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.65, p.234-243, 2013.

SANDOZ, J.C.; Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v.5, p.1-20, 2011.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, v.316, p.970-972, 2007.

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, p.e39114, 2012.

TAVARES, D.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. *In vitro* effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v.135, p.370-378, 2015.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. **Pest Management Science**, v. 57, 914-922, 2001.

vanENGELSDORP, D.; MEIXNER, M.D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.10, p.10-16, 2009.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, neste estudo, foram avaliados os efeitos do inseticida tiametoxam em fases do desenvolvimento pós-embriônico de *A. mellifera*, após a exposição aguda durante a fase larval. Através dos resultados, verificou-se que tanto por exposição tópica, como por exposição oral, as respostas das larvas à intoxicação ao inseticida, são observadas em doses/concentrações que são consideradas elevadas, quando comparadas com a exposição de abelhas adultas, como também aos níveis ambientais encontrados no campo (KRUPKE et al., 2014; MULLIN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012; PILLING et al., 2013; STONER E EITZER., 2012). No entanto, embora o inseticida possivelmente não cause fortes impactos na mortalidade larval, foi possível observar que efeitos tardios podem ser ocasionados em decorrência da exposição ao tiametoxam. Por exemplo, quando as larvas foram expostas a dose de 500 ng/ μ L do inseticida, embora esta dose tenha ocasionado menos que 50% de mortalidade larval após 48h de exposição, porcentagem de abelhas que posteriormente emergiram, foi quase nula. Dados como este, podem contribuir não somente para entender acerca dos efeitos do tiametoxam sobre as abelhas, mas também, contribuem na regulamentação e exigências para a comercialização e utilização dos inseticidas, visando proteger insetos não alvos, como é o caso das abelhas.

Quando as larvas foram oralmente expostas às concentrações subletais de 0,0001; 0,001 e 1,44 ng/ μ L foram observados consequentes efeitos sobre a sobrevivência, sobre tudo na sobrevivência das pupas do grupo exposto a 0,001 e 1,44 ng/ μ L refletindo diretamente na redução das abelhas emergentes. Também observou-se um aumento na atividade enzimática de AChE em todas as fases e concentrações analisadas, como também o aumento da atividade das enzimas de desintoxicação GST e CaEs nas pupas. Essas alterações enzimáticas demonstram, que a exposição durante a fase larval a concentrações que estão abaixo da letalidade, podem acarretar alterações na fisiologia durante o desenvolvimento. AChE, embora não esteja relacionada diretamente com o modo de ação do tiametoxam, possivelmente teve seus níveis elevados em decorrência da ligação irreversível do inseticida aos receptores de nicotina e acetilcolina, que possivelmente acarretou alterações na neurofisiologia do cérebro. Por serem enzimas de fase 1 e fase 2 da desintoxicação respectivamente, (BERENBAUM; JOHNSON, 2015), CaEs e GST, tiveram seus níveis aumentados, presume-se que seja uma tentativa de metabolizar o inseticida do organismo, em resposta a intoxicação.

Utilizando as mesmas concentrações e via de exposição, foi possível verificar alterações na imunomarcagem da proteína sinapsina nos corpos pedunculados e lobos antenais de pupas e recém-emergidas expostas ao tiametoxam. Nos corpos pedunculados, foram observadas diferenças no grupo exposto a 1,44 ng/ μ L, e em recém-emergidas nos grupos expostos a 1,44 e 0,001 ng/ μ L. Nos lobos antenais de pupas e recém-emergidas, foram observadas diferenças aos grupos expostos a 1,44 ng/ μ L. Esses resultados indicam o possível comprometimento das funções destas proteínas durante as sinapses nervosas. Pelo fato dos corpos pedunculados e lobos antenais serem estruturas altamente elaboradas para o desempenho das funções nervosas, estas alterações observadas, poderão implicar em danos nas atividades que dependem destas estruturas para sua execução, tais como atividades locomotoras, orientação aprendizado olfatório, dentre outras.

Seja nos efeitos do tiametoxam observados sobre sobrevivência, atividade enzimática, ou níveis de sinapsina, especial atenção deve ser dada aos efeitos observados nos grupos expostos a 0,001 ng/ μ L. Como as larvas foram expostas a esta concentração através de 30 μ L de dieta contaminada, utilizamos uma dose nominal de 0,03 ng. Sendo assim, podemos sugerir que a exposição a esta dose, que é compatível aos níveis que podem ser encontrados no interior da colônia, e que podem contaminar as larvas, pode acarretar e prejudicar o desenvolvimento de *A. mellifera*, como também impossibilitar a sobrevivência dos indivíduos expostos. Aqui, foi avaliado o efeito isolado do inseticida, no entanto, pode ser que, seus efeitos sobre o desenvolvimento pós-embrionário, possam ainda ser potencializados na presença de outros xenobióticos, tais como fungicidas e outros pesticidas.

7 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- A exposição larval de *A. mellifera* ao inseticida tiametoxam implica em toxicidade para as larvas, como também em efeitos tardios durante seu desenvolvimento.
- A exposição larval de *A. mellifera* a concentrações subletais do tiametoxam, conduz a efeitos na sobrevivência e consequente redução na porcentagem de emergência das abelhas.
- A exposição larval de *A. mellifera* a concentrações subletais do tiametoxam aumenta atividade enzimática de AChE, em todas as fases do desenvolvimento analisadas, e GST e CaEs tiveram seus níveis aumentados durante a fase de pupa.
- A exposição larval de *A. mellifera* a concentrações subletais do tiametoxam, altera os níveis de sinapsina nos corpos pedunculados e lobos antenais de pupas e recém-emergidas.

REFERÊNCIAS

- ABEL, R.; RYBAK, J.; MENZEL, R. Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 437, p.363-383, 2001.
- ANDREI. **Compêndio de defensivos agrícolas**. 8a edição. Editora Andrei: São Paulo, 2009. 1380p.
- AUPINEL, P.; FORTINI, D.; DUFOUR, H.; TASEI, J.-N.; MICHAUD, B.; ODOUX, J.-F.; PHAM-DELEGUE, M. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, v.58, p.107-111, 2005.
- AUPINEL, P.; FORTINI, D.; MICHAUD, B.; MAROLLEAU, F.; TASEI, J.-N.; ODOUX, J.-N. Toxicity of dimethoate and fenoxycarb to honeybee brood (*Apis mellifera*) using a new in vitro standardized feeding method. **Pest Management Science**, v.63, p.1090-1094, 2007.
- BABCZYNSKA, A; WILCZEK, G.; MIGULA, P. Effects of dimethoate on spiders from metal pollution gradient. **The Science of the Total Environment**, v.370, p.352-359, 2006.
- 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.
- BADIOU, A.; BRUNET, J.L.; BELZUNCES, L. Existence of Two Membrane-Bound Acetylcholinesterases in the Honey Bee Head. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.66, p.122-134, 2007.
- BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L.P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase--a biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.246-53, 2008.
- BADIOU-BENETEAU, A.; BENNEVEAU, A.; GERET, F.; DELATTE, H.; BECKER, N.; BRUNET, J.L.; REYNAUD, B.; BELZUNCES, L.P. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. **Environment International**, v. 60, p.31-41, 2013.
- BADIOU-BENETEAU, A.; CARVALHO, S.M.; BRUNET, J.L.; CARVALHO, G.A.; BULETÉ, A.; GIROUD, B.; BELZUNCES, L. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, v.82, p.22-31, 2012.
- BARATA, C.; LEKUMBERRI, I.; VILA-ESCALE, M.; PRAT, N.; PORTE, C. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin (NE Spain). **Aquatic Toxicology**, v.74 p.3-19, 2005.
- BELZUNCES, L.P.; GAUTHIER, M.; COLIN, M-E. Acetylcholinesterase in *Apis mellifera* head during post-embryonic development. Existence of a glycoinositol-anchored membrane form at early pupal stages. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.103, p.57-63, 1992.

BELZUNCES, L.P.; JEAN-JACQUES, L-R.; MICHEL, B. Properties of acetylcholinesterase from *Apis Mellifera* Heads. **Insect Biochemistry**, v.18, p.811-819, 1988.

BELZUNCES, L.P.; TOUTANT, J.-P.; BOUNIAS, M. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. Evidence for amphiphilic and hydrophilic forms characterized by triton X-114 phase separation. **Biochemical Journal**, v.255, p.463-470, 1988.

BENFENATI, F. Synapsins – Molecular function, development and disease. **Seminars in Cell & Development Biology**, v.22, p.377, 2011.

BERENBAUM, M.R.; JOHNSON, R.M. Xenobiotic detoxification pathways in honeybees. **Current Opinion in Insect Science**. v.10, p.51-58, 2015.

BICKER, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. **Microscopy Research and Technique**, v.45, p.174-183, 1999.

BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; van GESTEL, A.M.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v.21, p.973-972, 2012.

BOILY, M.; SARRASIN, B.; CHRISTIAN, D.; ARAS, P.; CHAGNON, M. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, v.20, p.5603-5614, 2013.

BRANDT, R.; ROHLFING, T.; RYBAK, J.; KROFCZIK, S.; MAYE, A.; WESTERHOFF, M. et al. Three-dimensional average-shape atlas of the honeybee brain and its applications. **Journal Neurology Comparative**, v.172, p.220-230, 2005.

BROMENSHENK, J.J.; HENDERSON, C.B.; WICK, C.H.; STANFORD, M.F.; ZULICH, A.W.; JABBOUR, R.E.; DESHPANDE, S.V.; MCCUBBIN, P.E.; SECCOMB, R.A.; WELCH, P.M.; WILLIAMS, T.; FIRTH, D.R.; SKOWRONSKI, E.; LEHMANN, M.M.; BILIMORIA, S.L.; GRESS, J.; WANNER, K.W.; CRAMER, R.A. JR. Iridovirus and Microsporidian Linked to Honey Bee Colony Decline. **Plos One**, v.5, e13181, 2010.

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

CARVALHO, S.M.; CARVALHO, G.A.; CARVALHO, C.F.; BUENO FILHO, J.S.S.; BAPTISTA, A.P.B. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para aabelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.595-603, 2009.

CHAPMAN, R.F. **The insects: structure and function**. New York, Cambridge University Press, 1998.

- CHIARI, W.C.; ARNAUT DE TOLEDO, V.A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, C.C.; OLIVEIRA, A.J.B.; SAKAGUTI, E.S.S.; ATTENCIA, V.M.; COSTA, F.M.; MITSUI, M.H. Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 31-36, 2005.
- CINTRA-SOCOLOWISKI, P.; ROAT, T.C.; NOCELLI, R.C.F.; NUNES, P.H.; FERREIRA, R.A.C.; MALASPINA, O.; BUENO, O.C. Sublethal doses of fipronil intensify synapsin immunostaining in *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) brains. *Pest management sci*, doi:10.1002/ps.4065, 2015.
- CLAUDIANOS, C.; RANSON, H.; JOHNSON, R.M.; BISWAS, S.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R.; FEYEREISEN, R.; OAKESHOTT, J.G. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect molecular biology**, v. 15, p. 615-636, 2006.
- COUSIN, M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; KRETZSCHMAR, A.; EL MAATAOUI, M.; BRUNET, J.L.; BELZUNCES, L.P. Size changes in honey bee larvae oenocytes induced by exposure to Paraquat at very low concentrations. **PloS One**, v.8, e65693, 2013.
- COUVILLON, M.J.; SCHÜRCH, R.; RATNIEKS, F.L.W. Waggle Dance Distances as Integrative Indicators of Seasonal Foraging Challenges. **PloS One**, v.9, e93495, 2014.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: UNESP, 2009. 408 p.
- CRUZ-LANDIM, C.; CHAUD-NETTO, J.; GONÇALVES, L.S. Morphological alterations in the compound eyes of eye-color mutants of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Revista Brasileira de Genética II**, v.3, p.223-231, 1979.
- DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL, A. H. **Introduction to insect biology and diversity**. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 1998. 680 p.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J.; CLUZEAU, S.; CHARRETON, M.; PHAM-DELÈGUE, M-H. Effects of imidaclopid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.57, p.410-419, 2004.
- DELAGE-DARCHEN, B.; RAMOS DE CONCONI, J.; AGUILAR, C. Comparaison entre l'équipement enzymatique des glandes salivaires et l'intestin moyen de diverses espèces d'abeilles sociales. **Apidologie**, v.13, p.265-273, 1982.
- DERECKA, K.; BLYTHE, M.J.; MALLA, S.; GENEREUX, D.P.; GUFFANTI, A.; PAVAN, P.; MOLES, A.; SNART, C.; RYDER, T.; ORTORI, C.A.; BARRETT, E.S.; STÖGER, R. Transient exposure to low levels of insecticide affects metabolic networks of honeybee larvae. **PLoS One**, v.8, e68191, 2013.
- DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-L. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology**, v.52, p. 81-106, 2007.

DEVILLERS, J. Acute toxicity of pesticides to honey bees. In: DEVILLERS, J. & PHAM-DELÈGUE, M.-H., **Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals**, Taylor & Francis: London, 2002. p.56-66, 2002.

DIAO, Q.; YUAN, K.; LIANG, P.; GAO, X. Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. **Journal Apicultural Research**, v.45, p.145-152, 2006.

DIEGELMANN, S.; KLAGGES, B.; MICHELS, B.; SCHLEYER, M.; GERBER, B. Maggot learning and synapsin function. **The Journal of Experimental Biology**, v.216, p.939-951, 2013.

ELLIS, D.J.; EVANS, J.D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**. v.49, p.134-136, 2010.

ELSTON, C.; THOMPSON, H.M.; WALTERS, K.F.A. Sub-lethal effects of thiamethoxam, a neonicotinoid pesticide, and propiconazole, a DMI fungicide, on colony initiation in bumblebee (*Bombus terrestris*) micro-colonies. **Apidologie**, v.44, p.563-574, 2013.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture – the international response. In: FREITAS, B.M.; PEREIRA, J.O.P. **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Imprensa Universitária: Fortaleza, 2004. p.19-22.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2009, In: <<http://faostat.fao.org>> acesso em julho de 2015.

FISCHER, J.; MÜLLER, T.; SPATZ, A.-K.; GREGGERS, U.; GRÜNEWALD, B.; MENZEL, R. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. **PLoS One** v.9, e91364, 2014.

GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SATTELE, J.; VAISSIERE, B.E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v.68, p.810-821, 2009.

GIANNINI, T.C.; 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**. v.108, p.849-857, 2015.

GILBERT, M.D, WILKINSON, C.F. Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.4, p.56-66, 1973

GILL, R.J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. **Nature**, doi: 10.1038/nature11585, 2012.

GIRLING, R.D.; LUSEBRINK, I.; FARTHING, E.; NEWMAN, T.A.; POPPY, G.M. Diesel exhaust rapidly degrades floral odours used by honeybees. **Science**, v.3, p.2779, 2013.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v.347, p.6229, 2015.

GROH, C.; KELBER, C.; GRÜBEL, K.; RÖSSLER, W. Density of mushroom body synaptic complexes limits intraspecies brain miniaturization in highly polymorphic leaf-cutting ant workers. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.281, p.1-9, 2014.

GROH, C.; TAUTZ, J.; ROSSLER, W. Synaptic organization in the adult honey bee brain is influenced by brood-temperature control during pupal development. **PNAS**, v.101,p.4268-4273, 2004.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.F.; AUPINEL, P.; et al. A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v.336, p. 348-350, 2012.

HILFIKER, S.; PIERIBONE, V.A.; CZERNIK, A.J.; KAO, H-T.; AUGUSTINE, G.J.; GREENGARD, P. Synapsins as regulators of neurotransmitter release. **The Royal Society**, v.354, p.269-279, 1999.

HOURCADE, B.; MUENS, T.S.; SANDOZ, J.C.; ROSSLER, W.; DEVAUD, J.M. Long-Term Leads to Synaptic Reorganization in the Mushroom Bodies: A Memory Trace in the Insect Brain? **The Journal of Neuroscience**, v.30, p.6461-6465, 2010.

HUMEAU, Y.; CANDIANI, S.; GHIRARDI, M.; POULAIN, B.; MONTAROLO, P. Functional roles of synapsins: Lessons from invertebrates. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.22, p. 425-433, 2011.

INÁCIO, F. R.; MARCHINI, L.C.; AMBROSANO, G.M.B; MORETI, A.C.C.C. Influência de diferentes espaçamentos de plantio na visitação de *Apis mellifera* L. e na produtividade da cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.). **Magistra**, v. 15, p. 93-10, 2003.

IWASA, T.; MOTOYAMA, N.; AMBROSE, J.T.; ROE, M. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, v.23, p.371-378, 2004.

JOHNSON, R.M. Honey bee toxicology. **Annual review of entomology**, v.60, p.415-34, 2014.

JOVANOVIĆ-GALOVIC, A.; BLAGOJEVIĆ, D.P.; GRUBOR-LAJŠIĆ, G.; WORLAND, R.; SPASIĆ, M.B. Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): Diapause and metamorphosis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.55, p.79-89, 2004.

KERR, W. E.; GONÇALVES, L.S.; BLOTTA, L.F.; MACIEL, H.B. Biologia comparada de abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*), africanas (*Apis mellifera adansonii*) e suas híbridas. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Apicultura**, v. 1, p. 151-185, Florianópolis – SC, 1970.

KESSLER, S.C.; TIEDEKEN, E.J.; SIMCOCK, K.L.; DERVEAU, S.; MITCHELL, J.; SOFTLEY, S.; STOUT, J.A.; WRIGHT, G. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature Letter**, doi: 10.1038/nature14414, 2015.

KEVAN, P. G.; PHILLIPS, T. P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology**, v. 5, n. 1, p. 8, 2001.

KLAGGES, B.R.E.; HEIMBECK, G.; GODENSCHWEGE, T.A.; HOFBAUER, A.; PFLUGFELDER, G.O.; REIFEGERSTE, R.; REISCH, D.; SCHAUPP, M.; BUCHNNER, S.; BUCHNER, E. Invertebrate Synapsins: A Single Gene Codes for Several Isoforms in *Drosophila*. **The Journal oh Neuroscience**, v.16, 3154-3165, 1996.

KLEIN, A-M.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; STEPHAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S.A.; KREMEM, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of crop pollinators in changing landscape for world crops. **Proccedings Biology Science**, v.274, p.303-313, 2007.

KOSTAROPOULOS, I.; PAPADOPOULOS, A.I.; METAXAKIS, A.; BOUKOUVALA, E.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Glutathione S–transferase in the defence against pyrethroids ininsects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.313-319, 2001.

KREISSL, S.; BICKER, G. Histochemistry of Acetylcholinesterase and Immunocytochemistry of an Acetylcholine Receptor-Like Antigen in the Brain of the Honeybee. **The Journal of Comparative Neurology**, v.286, p.71-74, 1989.

KREMEN, C.; WILLIAMS, N. M.; AIZEN, M. A.; GEMMILL-HERREN, B.; LEBUHN, G.; MINCKLEY, R.; PACKER, L.; POTTS, S. G.; ROULSTON, T.; STEFFAN-DEWENTER, I.; VAZQUEZ, D. P.; WINFREE, R.; ADAMS, L.; CRONE, E. E.; GREENLEAF, S. S.; T. H. KEITT; KLEIN, A.-M.; REGETZ, J.; RICKETTS, T. H. Pollination and other ecosystem services produced by mobile organism: a conceptual framework for the effects of land-use change. **Ecology Letters**, v.10, n.4, p.299-314, 2007.

KRUPKE, C.H.; HUNT, G.J.; EITZER, B.D.; ANDINO, G.; GIVEN, K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PloS One**, v.7, e29268, 2012.

LAYCOCK, I.; COTTERELL, K.C.; O'SHEA-WHELLER, T.A.; CRESSWELL, J.E. Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.100, p.153-158, 2014.

LYCETT, G.J.; MCLAUGHLIN, L.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; KAFATOS, F.C.; LOUKERIS, T.G.; PAINE, M.J. Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. **Insect Molecular Biology**, v.15, p.321-327, 2006.

MAIENFISCH,P.; ANGST, M.; BRANDL, F.; FISCHER, W.; HOFER, D.; KAYSER,H.; KOBEL,W.; RINDLISBACHER, A.; SENN, R.; STEINEMANN, R.; WIDMER, S.CHEMISTRY and biology of thiametoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, v.77, p.906-13, 2001.

MALASPINA, O.; STORT, A.C. Sucrose syrup-collecting behavior in Africanized and Caucasian bees and in the descendants of their crossings. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Genética, v. 10, p. 459-469, 1987.

MALASPINA, O.; SOUZA, T.F.; ZACARIN, E.C.; CRUZ, A.S.; JESUS, D. Efeitos provocados por agrotóxicos em abelhas no Brasil. In: **VIII Encontro Sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, SP, **Anais...**2008. p.41-48, 2008.

MALERBO-SOUZA D, T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Polinização em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck, var. Pera-rio) **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.237-242, 2003.

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM, S.D.; KLEIER, D.; RAUH, J.J.; GRAUSO, M.; SATTELLE, D.B. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. **Trends in pharmacological Sciences**, v.11, p.573-580, 2001.

MAXWELL, D.M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. **Toxicology Applied Pharmacology**, v.114, p.306-312,

MENZEL, R. **Learning, memory and “cognition” in honey bees**. In: Kesner RP, Olten DS, editors. *Neurobiology of comparative cognition*. Hillsdale, NJ: Erlbaum Inc. p 237–292, 1990.

MICHELETTE, E.R.F.; SOARES, A.E.E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). **Apidologie**, v.24, p.431-440, 1993.

MORETI, A.C de C.C. et al. Aumento na produção de sementes de girassol (*Helianthus annuus*) pela ação de insetos polinizadores. **Scientia Agricola**, v. 53, p. 34-40, 1996.

MORSE, R.A.; CALDERONE, N.W. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Culture, the magazine of American beekeeping**, v.128, 16p, 2000.

MOSS, D.W. Perspectives in alkaline phosphatase research. **Clinical Chemistry**, v. 38, p. 2486-2492, 1992.

MULLIN, C.A.; FRAZIER, M.F.; FRAZIER, J.L.F.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J.S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PloS One**, v. 5, e9754, 2010.

NAUEN, R.; BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. **Pesticide Outlook**. v.10, n.6, p.241-245 2002.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**. v.49, p.1-6, 2010.

NIELSEN, S.A.; BRODSGAARD, C.J.; HANSEN, H. Effects on Detoxification Enzymes in Different Life Stages of Honey Bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae) Treated with a Synthetic Pyrethroid (Flumethrin). **Seventeenth Scandinavian Cell Toxicology Congress**, v.28, p.437-443, 2000.

OECD. Guidelines for testing of chemicals: **Honeybees, acute oral toxicity test**. 1998.

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

OLIVEIRA, R.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, p.1122-1133, 2012.

OLIVEIRA-SILVA, J. J. et al. Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning, Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 35, p. 130-5, 2001.

PALMER, M.J.; MOFFAT, C.; SARANZEWA, N.; HARVEY, J.; WRIGHT, G.A.; CONNOLLY, C.N. Cholinergic pesticides cause mushroom body neural inactivation in honeybees. **Nature**, doi: 10.1038/ncomms2648, 2013.

PETTIS, J.S.; LICHTENBERG, E.M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; vanENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **Plos One**, v.98, p.1-9, 2013.

PILLING, E.; CAMPBELL, P.; COULSON, M.; RUDDLE, N.; TORNIER, I. A four-year field program investigating long-term effects of repeated exposure of honey bee colonies to flowering crops treated with thiamethoxam. **PloS One**, v. 8, e77193, 2013.

POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W.E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v.25, p.345-53, 2010.

RAMOS, A.R.; VIEIRA, G.H.C. Abelhas visitantes da cultura do girassol (*Helianthus annuus*) em área de cerrado. **Anais do encontro de iniciação científica-Enic**, v.1, n.2, 2011.

RANSON, H., HEMINGWAY, J. Glutathione transferases. **Comprehensive Molecular Insect Science-Pharmacology**. Elsevier, Oxford. v. 5, p. 383-402, 2005.

RATNIEKS, F.L.W.; CARRECK, N.L. Clarity on Honey Bee Collapse? **Science**, v.327, p.152-153, 2010.

R Development Core Team. R: **A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**. Vienna. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>, 2013.

ROAT, T.C.; LANDIM, C.D.C. Mitosis and cell death in the optic lobes of workers, queens and drones of the honey bee (*Apis mellifera*) during metamorphosis. **Journal of Biosciences**, v.35, p.415-425, 2010.

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.

ROSSI, C.A.; ROAT, T.C.; TAVARES, D.A.; CINTRA-SOŁOWSKI, P.; MALASPINA, O. Brain morphophysiology of africanized bee *Apis mellifera* Exposed to sublethal doses of

imidacloprid. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.65, p.234-243, 2013.

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.

SILVA-ZACARIN, E.C.M.; SOUZA, C.; TAVARES, D.A.; FERNANDEZ, F.; CARVALHO, S.M.; ROAT, T.C.; MALASPINA, O. Modifications of Aupinel's method for rearing africanized honey bee brood in laboratory conditions. In: **APIMONDIA**, 2011, Argentina.

SANDOZ, J.C.; Behavioral and neurophysiological study of olfactory perception and learning in honeybees. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v.5, p.1-20, 2011.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As abelhas como agentes polinizadores. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 7, p.1-6, 2007.

SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the honey bee**. Ithaca, New York, Comstock Publishing Associates, p.334, 1956.

SPADOTTO, C. A. et al. **Monitoramento de risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. 29 p. 2004.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, v.316, p.970-972, 2007.

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, e39114, 2012.

TAVARES, D.A.; ROAT, T.C.; CARVALHO, S.M.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; MALASPINA, O. *In vitro* effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v.135, p.370-378, 2015.

TOMIZAWA, M., CASIDA, J.E. Selective Toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Review of Entomology** v.48, p.339-64, 2003.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. **Pest Management Science**, v. 57, 914-922, 2001.

vanENGELSDORP, D.; MEIXNER, M.D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.10, p.10-16, 2009.

van ENGELSDORP, D.; SPEYBROECH, N.; EVANS, J.D.; NGUYEN, B.K.; MULLIN, C. Weighing risk factors associated with bee colony collapse disorder by classification and regression tree analysis. **Journal of Economic Entomology**, v.103, p.1517-1523, 2010.

WHITEHORN, P.R.; CONNOR, S.O.; WACKERS, F.L.; GOULSON, D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, doi: 10.1126/science.1215025, 2012.

WILLIAMSON, S.M.; WRIGHT, G.A. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **Journal Experimental Biology**, doi: 10.1242/jeb.083931, 2013.

WU, J.J.; ANELLI, C.A.; SHEPPARD, W.S.; Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. **Plos One**, v.6, e14720, 2011.

YANG, E.C.; CHANG, H.C.; WU, W.Y.; CHEN, Y.W. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **PloS One**, v.7, e49472, 2012.

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

ZHU, W.; SCHMEHL, D.R.; MULLIN, C.A.; FRAZIER, J.L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PloS One**, v.9, p.e77547, 2014.