

Fernanda Carolaine de Souza

AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO
POLINIZADOR-AGROTÓXICO POR MEIO DA
TOXICIDADE DO TIAMETOXAM EM
Frieseomelitta varia LEPELETIER, 1836
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

FERNANDA CAROLAINÉ DE SOUZA

Avaliação da Interação Polinizador-Agrotóxico por meio da
Toxicidade do Tiametoxam em *Frieseomelitta varia* Lepeletier, 1836
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientador: Lucas Miotelo

Rio Claro - SP
2022

S729a

Souza, Fernanda Carolaine de

Avaliação da interação polinizador-agrotóxico por meio da toxicidade do tiametoxam em *Frieseomelitta varia* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) / Fernanda Carolaine de Souza. -- Rio Claro, 2022

40 f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientador: Lucas Miotelo

1. neonicotinóide. 2. abelha sem ferrão. 3. ecotoxicologia. 4. atividade enzimática. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

FERNANDA CAROLAINÉ DE SOUZA

Avaliação da Interação Polinizador-Agrotóxico por meio da
Toxicidade do Tiametoxam em *Frieseomelitta varia* Lepeletier, 1836
(Hymenoptera, Apidae, Meliponini)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientador: Lucas Miotelo

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Osmar Malaspina (orientador)

Dra. Pâmela Decio

Me. Igor Vinicius Ramos Otero

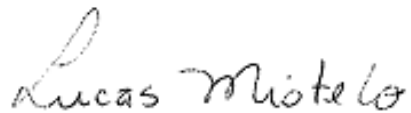
Aprovado em: 16 de novembro de 2022



Assinatura da discente



Assinatura do orientador



Assinatura do coorientador

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de iniciação científica (Processo: nº 129653/2020-9), que possibilitou parcialmente a realização desse estudo. Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), ao Departamento de Biologia Geral e Aplicada e ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (campus Rio Claro/SP) pelo apoio técnico fornecido.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, por ter realizado o convite de conhecer o LECA (Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas), e ter instigado minha curiosidade sobre o universo das abelhas logo no primeiro semestre da minha graduação. Ao Me. Lucas Miotelo, meu coorientador, por ter estado presente e solícito em todas as minhas fases, e ter respeitado e compreendido as minhas idas e vindas na academia. Serei eternamente grata por todo o apoio emocional e profissional, pelos ensinamentos e dedicação e, principalmente, por ter extrapolado a barreira da orientação e ter se tornado um amigo a quem admiro muito!

Aos membros do LECA, os quais me ajudaram e auxiliaram durante a realização desse estudo. O tempo compartilhado de trabalho e convivência foram de muito aprendizado para mim, e contribuíram para eu me encantar cada vez mais com as abelhas, me impulsionando estudá-las cada vez mais. Todos, direta ou indiretamente, tiveram papel essencial na construção do meu eu pessoal e profissional. Sou grata em especial à Geovana Maloni, a qual, além de parceira no LECA, também foi minha eterna duplinha em todos (absolutamente todos) os trabalhos da graduação. Sua companhia tornou essa jornada muito mais leve, e sempre serei grata pelas conversas e conselhos nos momentos difíceis.

Aos meus pais Manoel Neto de Souza e Ana Lucia de Souza, os quais sempre foram minha base em todos os momentos da minha vida, nunca medindo esforços em me apoiar e oferecer o melhor de si. Sempre serei grata por tudo que fizeram e têm feito por mim. Às minhas irmãs Rafaela Cristina de Souza e Mariana Cristina de Souza, pelo apoio, incentivo e companheirismo dado sempre. Ao meu cunhado Fábio Oliveira, quem sempre me anima e me tira risadas, mesmo nos dias difíceis. Família significa estar lá um para o outro, não importa o que aconteça. Sempre serei grata à todos vocês por terem me dado suporte e me impulsionado a estar onde estou hoje.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que participaram das minhas várias fases e etapas até aqui. Cada um que cruzou meu caminho contribuiu positivamente de alguma forma, e deixou sua marquinha na minha trajetória.

RESUMO

Apesar de não serem insetos-alvo, as abelhas são constantemente afetadas pelo uso indiscriminado de agrotóxicos nas plantações agrícolas. No Brasil, o inseticida tiametoxam (TMX), pertencente a classe dos neonicotinóides, vem sendo usado em larga escala e o seu uso está intimamente ligado ao risco ambiental de desaparecimento de abelhas. Embora seja reconhecido que os serviços ecossistêmicos prestados pelas abelhas sejam extremamente importantes, as abelhas nativas sem ferrão são pouco estudadas, existindo lacunas de conhecimento sobre questões biológicas, fisiológicas e comportamentais. Além disso, estudos recentes têm questionado se a atual espécie modelo utilizada em avaliações de risco para polinizadores, a *Apis mellifera*, é representativa para outros grupos de abelhas (solitárias e sem ferrão). Dessa forma, o presente estudo empregou três técnicas de avaliação de toxicidade do TMX para a espécie nativa *Frieseomelitta varia* após exposição à dieta contaminada com o inseticida: Concentração Letal Média (CL₅₀), Tempo Letal Médio (TL₅₀) e análise enzimática de Acetilcolinesterase (AChE), Carboxilesterase-3 (CaE-3) e Glutathione S-Transferase (GST) em forrageiras expostas a uma concentração subletal de TMX (CL_{50/10}). A CL₅₀ encontrada para *F. varia* foi de 0,6846 ng i.a./μL. Os resultados de TL₅₀ obtidos foram: 25 dias para a concentração CL_{50/10}, 27 dias para a concentração CL_{50/100} e 37 dias para o grupo controle. AChE não demonstrou regulação positiva ou negativa na presença de TMX para a espécie nos tempos analisados (um, cinco e dez dias). CaE-3 apresentou inibição enzimática no primeiro dia de exposição em cabeças e aumento de expressão em abdomens no décimo dia de análise. GST apresentou picos de expressão enzimática nos dias um e cinco em abdomens da espécie. Dessa forma, apesar da CL₅₀ obtida para *F. varia* ser menos tóxica do que a CL₅₀ de abelhas melíferas e outras espécies sem ferrão, ainda representa uma concentração baixa e pode ser considerada ambientalmente relevante. Os resultados de TL₅₀ demonstraram encurtamento de 11±1 dias na expectativa de vida das forrageiras na presença do inseticida, enfatizando que a sobrevivência de campeiras da espécie é comprometida devido a exposição contínua ao TMX. Embora AChE e CaE-3 não apresentaram destaque na detecção de efeitos tóxicos do TMX, não pode ser descartada a hipótese de que o TMX é tóxico para *F. varia*, uma vez que outras enzimas ou vias metabólicas podem ter apresentado um papel significativo na destoxificação do TMX. Por outro lado, a alta expressão de GST revela estresse na homeostase de *F. varia* causado pela exposição prolongada ao TMX, indicando a toxicidade do inseticida. Considerando que processos de estresse oxidativo podem estar ativos devido ao TMX, fato evidenciado pela

diferença de expressão de GST, estudos mais robustos que visem detectar estresse ou vias metabólicas de combate ao estresse podem representar abordagens promissoras para compreender melhor os efeitos do TMX em *F. varia*. De todo modo, o presente estudo traz resultados valiosos acerca da toxicidade do TMX em *F. varia*, podendo contribuir significativamente com a reavaliação de risco do TMX e futuras decisões acerca de seu uso.

Palavras-chaves: neonicotinóide; abelha sem ferrão; ecotoxicologia; atividade enzimática.

ABSTRACT

Despite not being target insects, bees are constantly affected by the indiscriminate use of pesticides in crops. In Brazil, the insecticide thiamethoxam (TMX), belonging to the neonicotinoid class, has been used on a large scale and its use is closely linked to the environmental risk of bees decline. Although it is recognized that the ecosystem services provided by bees are extremely important, native stingless bees are poorly studied, with knowledge gaps on biological, physiological and behavioral issues. In addition, recent studies have questioned whether the current model species used in risk assessments for pollinators, *Apis mellifera*, is representative of other groups of bees (solitary and stingless). Thus, the present study employed three TMX toxicity assessment techniques for the native species *Frieseomelitta varia* after exposure to a contaminated diet with the insecticide: Median Lethal Concentration (LC_{50}), Median Lethal Time (LT_{50}), and enzyme analysis of Acetylcholinesterase (AChE), Carboxylesterase-3 (CaE-3) and Glutathione S-Transferase (GST) in foragers exposed to a sublethal concentration of TMX ($LC_{50/10}$). The LC_{50} found for *F. varia* was 0.6846 ng a.i./ μ L. The LT_{50} results obtained were: 25 days for the $LC_{50/10}$ concentration, 27 days for the $LC_{50/100}$ concentration, and 37 days for the control group. AChE did not demonstrate positive or negative regulation in the presence of TMX for the species at the analyzed times (one, five and ten days). CaE-3 showed enzyme inhibition on the first day of exposure in heads and increased expression in abdomens on the tenth day of analysis. GST showed peaks of enzyme expression on days one and five in the abdomens of the species. Thus, although the LC_{50} obtained for *F. varia* is less toxic than the LC_{50} for honeybees and other stingless species, it still represents a low concentration and can be considered environmentally relevant. The TL_{50} results showed a shortening of 11 ± 1 days in the life expectancy of foragers in the presence of the insecticide. These results emphasizes that the foragers survival of the species is compromised due to continuous exposure to TMX. Although AChE and CaE-3 did not play a key role in the TMX toxicity detection, the hypothesis that TMX is toxic to *F. varia* cannot be eliminated due to other enzymes or metabolic pathways that may have played a significant role in the detoxification of the TMX. On the other hand, the high expression of GST reveals stress in the *F. varia* homeostasis caused by prolonged exposure to TMX, indicating the toxicity of the insecticide. Considering that oxidative stress processes may be active due to TMX (evidenced by the difference in GST expression), the use of approaches that could detect stress or stress-fighting metabolic pathways may significantly contribute to knowledge about TMX toxicity in *F. varia*. Furthermore, the present study brings valuable

results about the toxicity of TMX in *F. varia*, which can significantly contribute to the reassessment of TMX risk and future decisions about its use.

Keywords: neonicotinoid; stingless bee; ecotoxicology; enzymatic activity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Material Biológico	15
3.2	Proveniência e Condições de Teste.....	15
3.3	Determinação da Concentração Letal Média (CL ₅₀)	16
3.4	Determinação do Tempo Letal Médio (TL ₅₀).....	18
3.5	Análise de Atividade Enzimática.....	19
4	RESULTADOS	22
4.1	Concentração Letal Média (CL ₅₀).....	22
4.2	Tempo Letal Médio (TL ₅₀)	22
4.3	Atividade Enzimática.....	23
5	DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é imprescindível para manter toda a cadeia de relações sociais ou não presentes dentro de uma sociedade, e é a partir dela que se produzem os alimentos e os produtos primários utilizados pelas indústrias, pelo comércio e pelo setor de serviços, tornando-se a base para a manutenção da economia mundial (ASSAD; ALMEIDA, 2004). Porém, o ato de cultivar envolve diversos fatores para que a colheita seja efetiva, envolvendo outros seres vivos no processo, além da espécie humana. Pertencente a esse grupo de seres, devem ser ressaltados os agentes polinizadores, os quais prestam um serviço ecossistêmico fundamental para obtenção de bons resultados na agricultura: a polinização (FREITAS; PEREIRA, 2004).

A polinização é um evento essencial para manutenção da biodiversidade da flora e produção dos principais alimentos da base alimentar da população mundial (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2011). Durante esse evento, células reprodutivas masculinas (grãos de pólen), localizados nas anteras das flores encontram-se com o receptor feminino floral (estigma), culminando na germinação dos grãos de pólen, os quais, a partir desse momento, são capazes de fecundar os óvulos presentes nos ovários das plantas. Esse processo resultará na formação de sementes e frutos, os quais irão garantir a perpetuação e a preservação de todos os ecossistemas globais existentes (FREITAS; IMPERATRIZ-FONSECA, 2005; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2014; RECH, 2014).

Uma vez que as plantas não são capazes de se deslocarem ao encontro de parceiros sexuais, agentes polinizadores são responsáveis pela polinização dos vegetais, esses podendo ser: ar, água, gravidade e diferentes seres vivos (KEVAN; IMPERATRIZ-FONSECA, 2002). Indispensáveis ao sucesso das lavouras, a contribuição dos agentes polinizadores vivos à agricultura pode alcançar em torno de US\$ 12 bilhões de dólares anuais nas culturas brasileiras dependentes de sua polinização (GIANINNI *et al.*, 2015). Inclusas nesse cenário destacam-se as abelhas, principais responsáveis pela polinização das culturas agrícolas de todo o mundo. Em um levantamento realizado em 2004 obteve-se que, 73% das espécies vegetais cultivadas mundialmente são polinizadas por abelhas, 19% por moscas, 6,5% por morcegos, 5% por vespas, 5% por besouros, 4% por pássaros e 4% por borboletas e mariposas (FAO, 2004).

Diversos estudos conduzidos nas últimas décadas comprovam a relação de dependência da agricultura com as abelhas, uma vez que a quantidade e qualidade da produção de frutos, vegetais e sementes estão intimamente ligadas a uma polinização adequada (BANDA; PAXTON, 1991; KEARNS; INOUE; WASER, 1998; WITTER; BLOCHTEIN, 2003; MALERBO-SOUZA; NOGUEIRA-COUTO; COUTO, 2004; FREITAS; IMPERATRIZ-

FONSECA, 2005). Em um estudo conduzido por ROUBIK (2018), foram listadas 1.330 culturas agrícolas cultivadas nos trópicos, das quais foi comprovado que 70% necessitam de polinização por abelhas para obtenção de uma colheita produtiva.

Apesar da importância das abelhas para preservação da biodiversidade dos ecossistemas, esses polinizadores têm enfrentado diversos problemas decorrentes de atividades antropogênicas, tais como: fragmentação de habitat, aumento das áreas de monoculturas, mudanças climáticas, introdução de espécies exóticas, entre outras. Porém, o grande adversário das abelhas, o qual têm sido destaque devido a sua nocividade à esses insetos, é o intenso uso de agrotóxicos nas culturas agrícolas atuais (KEARNS; INOUE; WASER, 1998; POTTS *et al.*, 2010; ROUBIK, 2018). Quando as abelhas campeiras saem para forragear, mesmo não sendo insetos-alvo, ficam vulneráveis a exposição dos agrotóxicos via oral, por meio da ingestão de pólen e néctar contaminados, ou contato, se contaminando com nuvens de pulverização e/ou através de superfícies atingidas pela aplicação dos agrotóxicos (CHAM *et al.*, 2017).

O tiametoxam - TMX ($C_8H_{10}ClN_5O_3S$), pertencente à classe dos inseticidas neonicotinóides, é utilizado nas culturas agrícolas brasileiras e apontado como ingrediente ativo de risco para as abelhas (CHAM; SILVA; OLIVEIRA, 2017). Proveniente da nicotina, os neonicotinóides agem no sistema nervoso central dos insetos ligando-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina, bloqueando-os e causando paralisia e morte, além de afetar funções de orientação, memória e aprendizado. (FAIRBROTHER *et al.*, 2014; TOMIZAWA; CASIDA, 2005; TURNER, 2015). Devido ao fato de o TMX atuar sistemicamente nas plantas e sementes, seus resíduos podem ser encontrados no néctar e pólen das flores, o que significa que polinizadores podem ser expostos a concentrações subletais desse inseticida durante o forrageamento (FORD; CASIDA, 2008; BASS; FIELD, 2018).

Em diversos países, os testes laboratoriais para registro de agrotóxicos se baseiam nas normativas criadas pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Essas normativas estabelecem o uso da abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 como modelo para as análises de avaliação de agrotóxicos em polinizadores (OECD, 1998a; OECD, 1998b). A espécie *A. mellifera* é mundialmente utilizada como organismo-teste representante por ter ampla distribuição, a biologia ser bem conhecida e ter a possibilidade de ser mantida e criada em laboratório (BOYLE *et al.*, 2019). No entanto, há questionamentos sobre até que ponto *A. mellifera* pode servir como modelo representativo para as demais espécies de abelhas (sem ferrão e solitárias) na avaliação de risco para agrotóxicos (BOYLE *et al.*, 2019; CHAM *et al.*, 2019).

No Brasil, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), um dos órgãos governamentais envolvidos no registro de agrotóxicos em solo nacional, também se baseia em estudos com *A. mellifera*. Porém, em 2015 foi criado o Grupo Técnico de Trabalho (GTT) coordenado pelo IBAMA, e composto por representantes da academia, da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), da indústria e do Ministério do Meio Ambiente, com o intuito de discutir procedimentos de avaliação de risco para polinizadores. Dessa forma, o GTT teve por objetivo, discutir e propor métodos de avaliação de risco de agrotóxicos para polinizadores, adequados à realidade do Brasil, levando em consideração as abelhas nativas sem ferrão e solitárias. Uma das principais propostas do GTT foi a construção de uma matriz de seleção de espécies de abelhas nativas, com o intuito de escolher potenciais espécies-padrão para as análises de risco de agrotóxicos para abelhas no Brasil (PIRES; TOREZANI, 2018). Dentre 20 espécies de abelhas sociais classificadas como potenciais para serem testadas em avaliações de risco de agrotóxicos, a espécie escolhida para o presente estudo, *Frieseomelitta varia* Lepeletier, 1836, recebeu a nona classificação nesta matriz.

Conhecida popularmente como “Marmelada Amarela”, a espécie *F. varia* é uma abelha pequena (0,5-0,6 mm de comprimento), social, com hábito de cleptoparasitismo facultativo, e, assim como todas as outras abelhas da tribo *Meliponini*, possui o ferrão atrofiado (NUNES *et al.*, 2008). Sua distribuição geográfica ocorre nos seguintes estados: Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo e Tocantins (IMPERATRIZ-FONSECA *et al.*, 2011). A arquitetura do ninho de *F. varia* é diferenciada, sendo que seus favos são construídos em forma de cachos, e diferentemente da maioria das abelhas sem ferrão, essa espécie não constrói invólucros ao redor dos discos de cria, tendo uma maior dificuldade em controlar a homeostase termal de suas colônias (SBORDONI, 2015). Além disso, a entrada de suas colônias são pequenos orifícios envoltos por uma camada de resina de planta, com largura para apenas uma abelha entrar por vez, sendo comumente protegidas por uma guarda bloqueando a entrada das colônias e uma a três guardas patrulhando o lado de fora do ninho (COUVILLON; RATNIEKS, 2008).

Recentes estudos em culturas agrícolas no Brasil revelam que o gênero *Frieseomelitta* é um dos agentes polinizadores de culturas pulverizadas por TMX, tais como: algodão (*Gossypium hirsutum* L.), pimentão (*Capsicum annuum*), girassol (*Helianthus annuus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), abobrinha (*Cucurbita pepo* L.) e frutas cítricas (*Citrus spp.* L.) (ANVISA, 2019; WOŁOWSKI *et al.*, 2019; KLEIN *et al.*, 2020). Dessa forma, ao forragearem nas culturas anteriormente citadas, estas abelhas ficam expostas, além de poderem levar

recursos contaminados por TMX para o ninho, podendo comprometer toda a colônia com os efeitos nocivos do inseticida. Apesar das publicações disponíveis na literatura sobre *F. varia*, informações aprofundadas sobre biologia, fisiologia e comportamento dessa espécie ainda são escassas, evidenciando lacunas de conhecimento e urgência no desenvolvimento de estudos diversos que envolvam essa espécie de abelha sem ferrão, incluindo análises de relação entre agrotóxicos e *F. varia*.

Para compreender os impactos dos agrotóxicos nos seres vivos, bioensaios ecotoxicológicos e de bioindicadores têm sido cada vez mais utilizados em análises de efeitos nocivos de agrotóxicos nos seres vivos (WALKER *et al.*, 2012). Alguns dos testes ecotoxicológicos clássicos mais empregados são para determinação da Concentração Letal Média (CL₅₀), a qual representa a concentração de um alimento contaminado, de uma substância tóxica ou de um produto químico, capaz de causar mortalidade de 50% dos indivíduos em um determinado período de tempo, e o Tempo Letal Médio (TL₅₀), que irá demonstrar o tempo de sobrevivência de 50% dos indivíduos expostos a concentrações subletais de alimento contaminado por um período de tempo prolongado (OECD, 1998a, 1998b; RORTAIS *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2009; IBAMA, 2017).

Bioindicadores ou marcadores biológicos são indicadores de algum estado fisiológico de um organismo, podendo ser de diversos tipos: células específicas, moléculas, genes, hormônios ou enzimas (AMORIM, 2003). Dessa forma, para avaliar a nocividade de agrotóxicos nos tecidos das abelhas, algumas enzimas podem ser utilizadas como biomarcadores (BADIOU-BÉNÉTEAU *et al.*, 2012). Sabendo-se dos efeitos causados pelo inseticida TMX em abelhas, enzimas envolvidas na formação das sinapses colinérgicas (espaço cerebral onde ficam alocados os receptores nicotínicos envolvidos nas transmissões dos impulsos nervosos) e no processo de destoxificação podem ser utilizadas para indicar a vitalidade desses organismos após a exposição ao agrotóxico, sendo elas: (1) Acetilcolinesterase (AChE), encontrada no cérebro das abelhas, a qual é responsável por auxiliar na propagação do impulso nervoso, por meio da inativação do neurotransmissor acetilcolina (ACh), hidrolisando-o em acetato e colina; (2) Carboxilesterase-3 (CaE-3), encontrada no cérebro e intestino das abelhas, a qual é responsável por atuar na destoxificação de compostos orgânicos, atuando na hidrólise de agentes químicos e convertendo-os em metabólicos não tóxicos; e (3) Glutathione S-Transferase (GST), também encontrada no intestino e cérebro das abelhas, a qual é responsável pela destoxificação celular através da catálise da conjugação de compostos exógenos (MOTA *et al.*, 2012; TOMAZETTI; SILVA; TUERLINCKX, 2017; OLIVEIRA, 2012).

Tendo em vista que os testes toxicológicos clássicos (CL₅₀ e TL₅₀) servem como base para compreender quais são os possíveis efeitos tóxicos do TMX em *F. varia*, aliar essa abordagem juntamente com ensaios que visam detectar alterações em bioindicadores enzimáticos (AChE, CaE-3 e GST) representam abordagens promissoras para avançar as fronteiras de conhecimento acerca da espécie e a exposição ao TMX. Dessa forma, as abordagens utilizadas buscaram contribuir com a construção de argumentos sólidos que possam ser utilizados para proteção e preservação dessa espécie nativa. Além disso, mas não menos importante, os resultados obtidos foram comparados com dados de *A. mellifera* encontrados na literatura, com o intuito de compreender se os testes realizados com a espécie modelo são ambientalmente seguros e representativos para *F. varia*, e, consequentemente, para outras espécies de abelhas sem ferrão.

2 OBJETIVO

Tendo em vista que as abelhas são agentes polinizadores que prestam serviços ecossistêmicos essenciais e, em contrapartida, o inseticida TMX é amplamente usado nas culturas agrícolas do Brasil podendo resultar na intoxicação de abelhas nativas da espécie *F. varia*, o presente trabalho teve por objetivos:

1. Determinar a Concentração Letal Média (CL₅₀) do TMX para abelhas campeiras de *F. varia*;
2. Determinar o Tempo Letal Médio (TL₅₀) de *F. varia* expostas a duas concentrações subletais do inseticida (CL_{50/10} e CL_{50/100});
3. Avaliar a Atividade Enzimática de cabeças e abdomens de abelhas expostas à uma concentração subletal de TMX (CL_{50/10}) a partir dos biomarcadores de exposição: Acetilcolinesterase (AChE), Carboxilesterase-3 (CaE-3) e Glutathione S-Transferase (GST).

3 MATERIAL E MÉTODOS

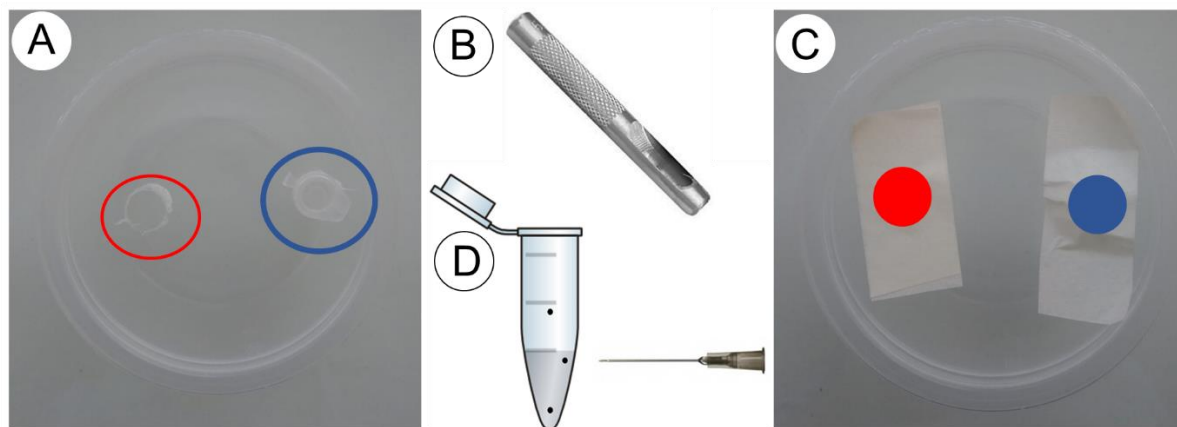
3.1 Material Biológico

Foram utilizadas seis diferentes colônias não-irmãs da espécie *F. varia*, das quais foram coletadas abelhas forrageiras no período da manhã. As abelhas foram coletadas diretamente da entrada das respectivas colônias no momento em que estavam saindo para forragear, para que, dessa forma, fosse evitado que as abelhas já tivessem sido previamente expostas à inseticidas em campo.

3.2 Proveniência e Condições de Teste

Para cada bioensaio empregado, as abelhas coletadas foram mantidas em gaiolas plásticas descartáveis de 250 mL. Cada gaiola continha oito fileiras de furos nas laterais, feitas com o auxílio de uma agulha de 0.7x25mm de calibre e cor de canhão preta, com o objetivo de fornecer circulação de ar para as abelhas. As tampas das gaiolas continham dois furos (Figura 1-A), um deles era destinado a retirada das abelhas mortas e o outro destinado a inserção do alimentador, e ambos foram recobertos com fita adesiva para evitar fuga das abelhas (Figura 1-C). Para obtenção de tais furos, foi utilizado um furador de couro nº8 (Figura 1-B). Como alimentador, foi utilizado um microtubo do tipo eppendorf de 1,5 mL contendo um furo central e dois em suas extremidades (Figura 1-D), todos feitos com uma agulha de 0.7x25mm de calibre e cor de canhão preta. Os furos permitiram a inserção da probóscide das abelhas durante a alimentação. Como alimento, foi fornecida uma solução de sacarose (50% açúcar e 50% água v/m) com ou sem TMX. As gaiolas contendo as abelhas coletadas foram mantidas em estufas do tipo B.O.D. com temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e umidade relativa de $70\% \pm 10\%$ em constante escuridão durante todo o tempo de execução de cada bioensaio. Apesar de se basear nos padrões da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998a, 1998b) para a realização dos ensaios biológicos, foram realizadas adaptações para abelhas sem ferrão, sendo elas: adaptações nas gaiolas plásticas (diâmetro dos furos, alimentador e número de abelhas por gaiola) e temperatura e umidade da estufa.

Figura 1 – Representação da montagem das gaiolas de bioensaio. **A** – Posição dos furos para encaixe de alimentador (círculo em azul) e retirada de abelhas (círculo em vermelho). **B** – Furador de couro nº8 utilizado para produzir furos representados na figura A. **C** – Furos para encaixe de alimentador (azul) e retirada de abelhas (vermelho) recobertos com fita adesiva. **D** – Representação do esquema de furos nos alimentadores destinado à projeção da probóscide das abelhas.



Fonte: elaborado pela autora (2022)

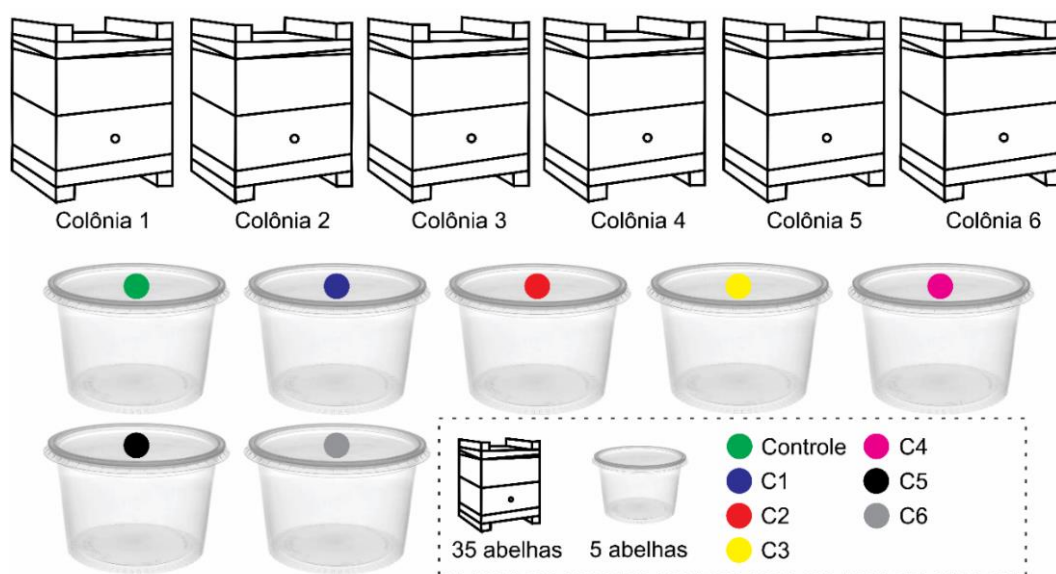
Em todos os bioensaios, foi disponibilizado açúcar diluído em água (solução de sacarose; 50% v/m) sem contaminação para o grupo controle. Já para os grupos expostos, foi ofertado alimento contaminado com a formulação técnica do TMX PESTANAL® ($C_8H_{10}ClN_5O_3S$), Sigma Aldrich, solúvel em água e pureza de 98,0%. Em ambos os grupos amostrais o alimento esteve disponível *ad libitum*. Para exposição ao TMX, foi preparada uma solução estoque na proporção 1:1 (10 mg de TMX para 10 mL de água deionizada), resultando em uma concentração final de 1.000 ng de ingrediente ativo/ μ L (ng i.a./ μ L).

3.3 Determinação da Concentração Letal Média (CL_{50})

Foram utilizadas triplicatas para os grupos experimentais, sendo que o grupo exposto foi composto por 90 abelhas forrageiras (cinco abelhas/concentração/unicata) e o grupo controle foi composto por 15 abelhas (cinco abelhas/unicata). Cada gaiola recebeu cinco abelhas para exposição ao alimento contaminado, com exceção do grupo controle que recebeu apenas solução de sacarose pura (Figura 2). É válido ressaltar que as gaiolas comportaram apenas cinco abelhas ao invés de dez (valor habitual dos bioensaios com abelhas sem ferrão para CL_{50}) devido ao baixo número populacional da espécie, e devido a isso, foram conduzidos seis bioensaios para obtenção da CL_{50} ao invés de três (valor adotado para bioensaios com abelhas sem ferrão com número populacional suficiente para a coleta de até 70 indivíduos por colônia), sendo que os resultados dos seis bioensaios foram contabilizados no resultado final da

CL₅₀. Foi respeitado o intervalo de 15 dias entre coletas por colônia a fim de evitar queda drástica no número populacional de forrageiras, tendo sido intercaladas coletas semanais das colônias 1-3 e 4-6.

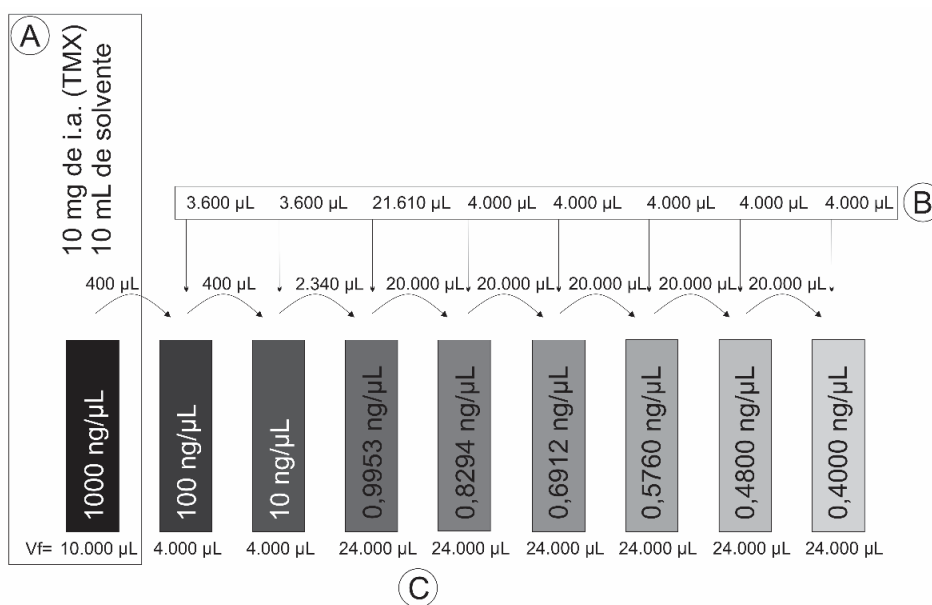
Figura 2 – Esquema de coleta e disposição de abelhas de *F. varia* em gaiolas durante bioensaio de CL₅₀. As cores representam as seis diferentes concentrações de TMX utilizadas, além do grupo controle ilustrado em verde. As gaiolas experimentais representadas no esquema exemplificam a coleta em apenas uma colônia, tendo sido coletado um grupo controle e seis diferentes concentrações (sete gaiolas plásticas). Foram coletadas cinco abelhas por gaiola, totalizando 35 indivíduos por colônia. Em cada coleta foram utilizadas três diferentes colônias.



Fonte: elaborado pela autora (2022)

Seis concentrações e um grupo controle foram utilizados para determinação da CL₅₀. As concentrações se basearam no trabalho de Dos Reis (2017), no qual foram utilizadas as concentrações 1,0, 0,47, 0,22, 0,10 e 0,05 ng de i.a./μL do inseticida TMX na determinação da CL₅₀ para *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. A cascata de diluições foi preparada a partir de uma solução de sacarose (água e açúcar 1:1) diluída em solução estoque de TMX e água na proporção de 10 mg de TMX (Figura 3).

Figura 3 – Mapa para diluição em cascata utilizado na obtenção das concentrações do bioensaio de CL₅₀. **A** – Solução estoque preparada a partir de TMX + água. **B** – Quantidade/volume de solução de sacarose pura (água e açúcar 1:1) adicionada em cada concentração. **C** – Volume final de cada concentração considerando a quantidade de solução de sacarose pura + quantidade de solução adicionada de uma concentração à sua subsequente.



Fonte: elaborado pela autora (2022)

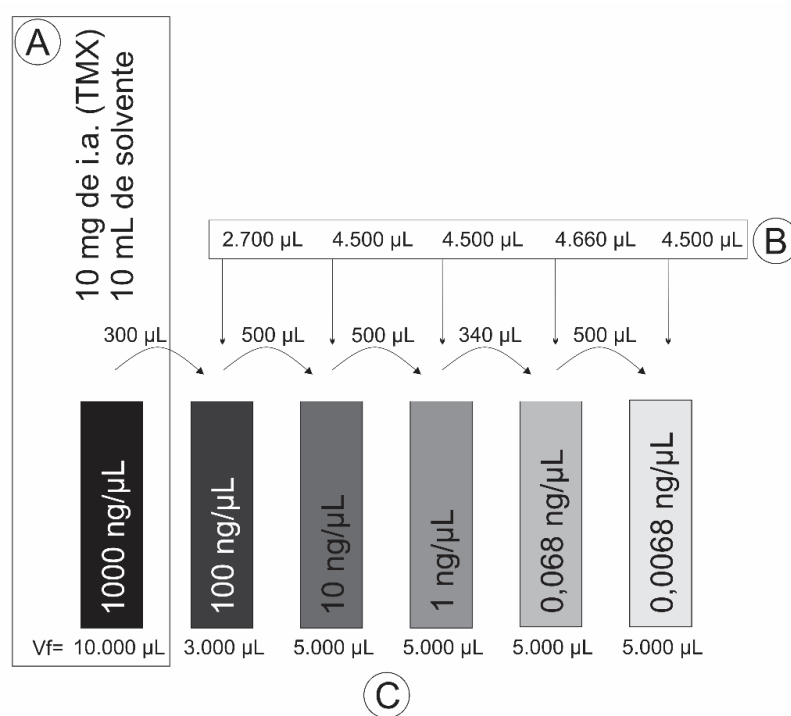
Após 24 horas foi contabilizado a mortalidade das abelhas. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise estatística na interface RStudio do *software* R, onde foram testados quatro modelos binomiais generalizados: *logit*, *probit*, *log-log complementar* e *cauchit* (VENABLES; RIPLEY, 2002). A confirmação do ajuste do modelo foi dada por meio de um envelope contido no pacote *hnp* do próprio *software* (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017).

3.4 Determinação do Tempo Letal Médio (TL₅₀)

A partir da aquisição da CL₅₀ descrita anteriormente, foi obtido o TL₅₀ por meio da exposição das abelhas às duas concentrações subletais de TMX. Nessa fase, forrageiras de *F. varia* foram submetidas à alimentação contaminada equivalente a CL_{50/10} (0,068 ng/μL) e CL_{50/100} (0,0068 ng/μL), ou seja, o valor obtido da CL₅₀ foi dividido por 10 e por 100, e por meio de uma cascata de diluições, foram obtidas as concentrações equivalentes a esses valores (Figura 4). Diferentemente do realizado para CL₅₀, os grupos experimentais nessa etapa contemplaram 10 abelhas por gaiola, uma vez que apenas duas concentrações foram utilizadas para exposição, além do grupo controle, totalizando 30 abelhas coletadas por colônia. Para determinação do TL₅₀, os grupos experimentais foram realizados em triplicata, e três bioensaios foram conduzidos no total. É válido ressaltar que entre as repetições dos bioensaios também foi

respeito o intervalo de 15 dias entre coletas. Para análise estatística, foi usado o *software* SigmaPlot (versão 14.0), a fim de analisar o tempo de sobrevivência de 50% dos indivíduos em condições subletais do inseticida TMX para a espécie. Para tanto, foi aplicado o teste de LongRank (KAPLAN; MEIER, 1958) e verificado que os limites preditos pelo modelo ($p\text{-value} > 0.05$) não foram ultrapassados. Sendo assim, foi considerado que os valores do TL_{50} apresentaram diferença significativa. Com a obtenção da TL_{50} , foram determinados três dias para análise da atividade enzimática, sendo eles: um, cinco e dez dias de exposição ao TMX.

Figura 4 – Mapa para diluição em cascata utilizado na obtenção das concentrações do bioensaio de TL_{50} . **A** – Solução estoque preparada a partir de TMX + água. **B** – Quantidade/volume de solução de sacarose pura (água e açúcar 1:1) adicionada em cada concentração. **C** – Volume final de cada concentração considerando a quantidade de solução de sacarose pura + quantidade de solução adicionada de uma concentração à sua subsequente.



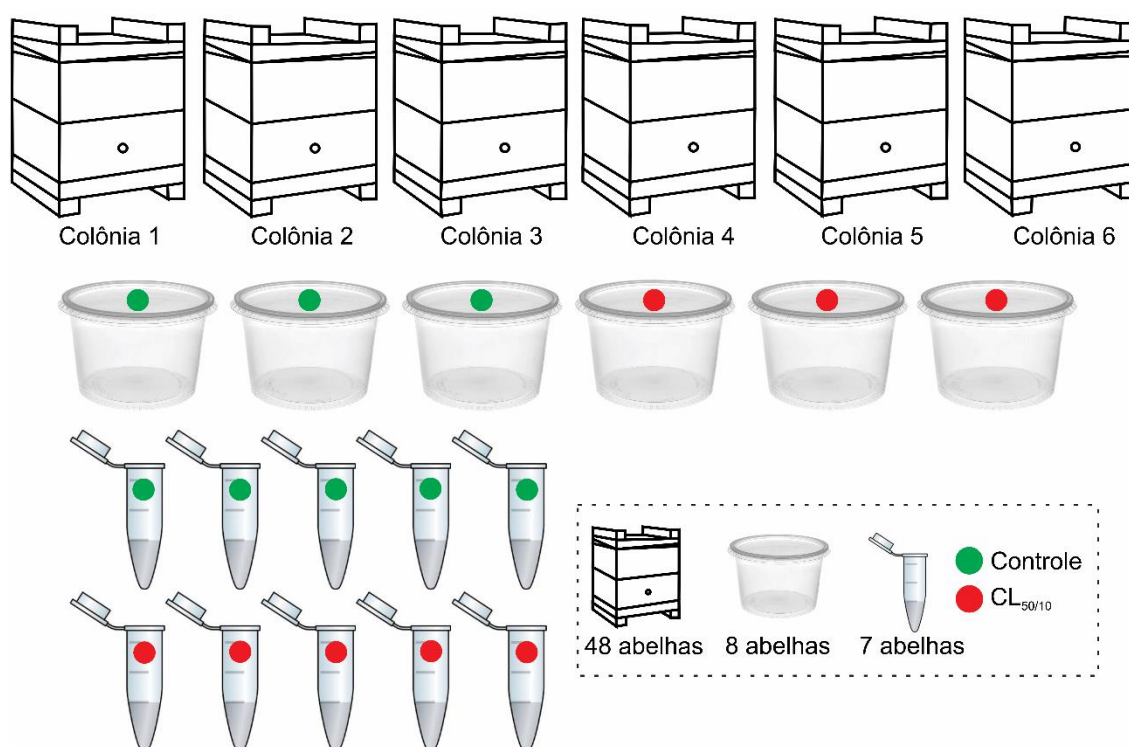
Fonte: elaborado pela autora (2022)

3.5 Análise de Atividade Enzimática

Para a análise de atividade enzimática, devido ao baixo número populacional por colônia de *F. varia* que limitou uma maior quantidade de coleta de indivíduos, foi usada somente a concentração de $CL_{50/10}$. Foram utilizadas seis colônias ao todo, das quais foram coletadas 48 abelhas/colônia. As abelhas foram dispostas em 36 gaiolas contendo oito abelhas em cada. Nos respectivos dias de análise da atividade enzimática (um, cinco e dez dias), sete

abelhas de cada gaiola foram aleatoriamente selecionadas para serem alocadas nos microtubos de extração/preparação dos órgãos (Figura 5). Foi avaliada a atividade enzimática de três enzimas importantes para o funcionamento pleno do organismo das abelhas: CaE-3 e GST, as quais foram analisadas nas cabeças e nos abdomens dos indivíduos, e AChE, a qual foi analisada apenas na cabeça das abelhas.

Figura 5 – Esquema de coleta e disposição de abelhas de *F. varia* em gaiolas/microtubos para posterior análise estatística em cabeças e abdomens. Ressalta-se que as gaiolas experimentais representadas no esquema exemplificam a coleta em apenas uma colônia, tendo sido coletadas 48 abelhas por colônia, distribuídas em três gaiolas destinadas ao grupo controle (cor verde, oito abelhas por gaiola) e três gaiolas destinadas à exposição ao TMX (cor vermelha, oito abelhas por gaiola). Para obter o número amostral suficiente para as extrações, foram utilizadas as seis colônias. Seguindo o mesmo padrão, os microtubos representam apenas o número amostral de abelhas utilizadas em um dia de extração enzimática. Em cada microtubo foram colocadas sete cabeças/abdomens, sendo utilizados cinco microtubos por grupos amostral (totalizando 35 abelhas para o grupo controle e 35 abelhas para o grupo TMX). Esse procedimento foi realizado em um, cinco e dez dias de experimento.



Fonte: elaborado pela autora (2022)

Foram coletados sete cabeças e sete abdomens das abelhas de cada grupo experimental (controle e exposto $CL_{50/10}$). As partes corpóreas foram imersas em uma solução contendo tampão fosfato de sódio 40 mM pH 7,4, 10 mM de cloreto de sódio, 1% (m/v) de Triton X-100 e uma mistura de inibidores 200x (2 μ g/mL de antipaina, leupeptina e pepstatina A; 25 unidades/mL de aprotinina e 0,1mg/mL inibidor de tripsina) para obter 10% (m/v) de extrato. Após isso, a solução contendo as cabeças ou abdomens foi submetida a um disruptor de células

e tecidos L-BEADER 6 Loccus® em ciclos de 30 segundos (30Hz), sendo que as cabeças tiveram dois ciclos de maceração e os abdomens três. Por fim, o extrato obtido foi centrifugado em uma velocidade de 15.000 xg durante 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante resultante da centrifugação foi utilizado para análise enzimática. Durante todos os processos, os microtubos utilizados sempre estiveram imersos em gelo, a fim de evitar a degradação das amostras. As análises foram feitas em placas de 96 poços à 24°C e com volume de reação de 200 µL. Cada amostra foi plaqueada três vezes e as leituras foram realizadas em triplicata em uma leitora de placas Molecular Devices (VersaMax), onde os resultados foram apresentados em micromol de substrato hidrolisado por minuto e por miligrama de proteína (DECIO *et al.*, 2021a; ALMASRI *et al.*, 2020).

Para a análise de AChE, foi utilizado como base o método de Ellman e colaboradores (1961) e modificado por Belzunces e colaboradores (1988). Foi adicionado 100 mM tampão fosfato pH 7,0; 0,3 mM de iodeto de acetiltiocolina; 1,5 mM de ácido 5,5'ditiobis (2-nitrobenzóico) ao sobrenadante das cabeças das abelhas. As leituras foram feitas a 412 nm.

Para análise de CaE-3, foram utilizados os métodos descritos por Tavares e colaboradores (2017) e Almasri e colaboradores (2020), os quais determinaram o uso de substrato contendo 100 mM tampão fosfato 5X pH 7,0, 0,1mM de BW284C51 10X (inibidor de acetilcolinesterase) e 1mM de p-Nitrophényl acétate. Foi adicionado o sobrenadante das cabeças ou abdomens das abelhas e, em seguida, as leituras foram feitas a 410nm (BADIOU-BÉNÉTEAU *et al.*, 2012).

Para análise da GST, foi utilizado como base o trabalho de Badiou-Bénéteau e colaboradores (2012). As cabeças ou abdomens das abelhas foram imersas em um meio contendo extrato celular, 1mM de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), 2,5 mM de GSH (glutathiona reduzida), 1 mM 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno como substrato e 100 mM de fosfato de sódio pH 7,4. Por fim, a leitura foi feita a 340 nm

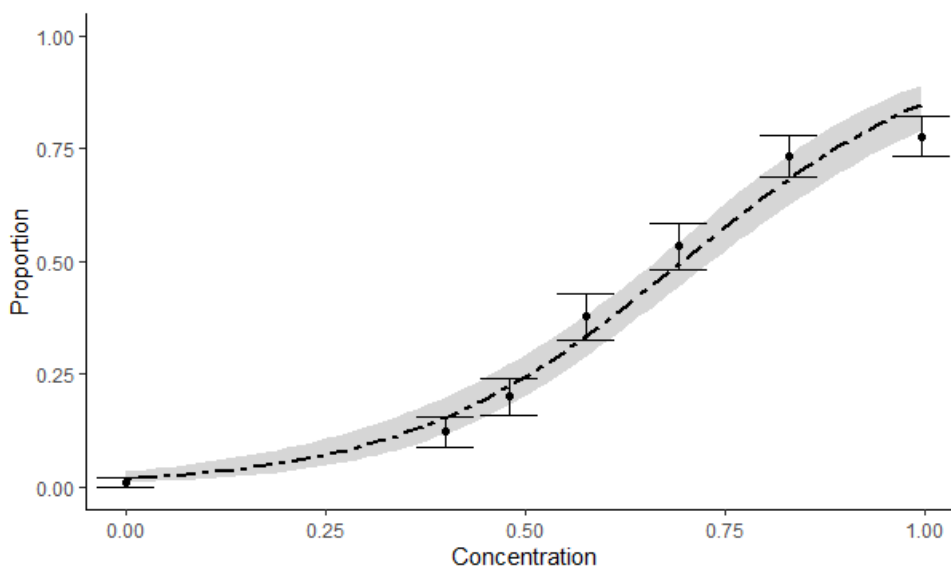
As amostras foram lidas por cinética enzimática ou *endpoint* em uma leitora de placas. Os dados obtidos da leitura foram então plotados no *software* R versão 3.5.0. (R CORE TEAM, 2018). Foi verificada a homogeneidade dos dados por meio do teste de Bartlett, e após isso, foram utilizados os pacotes *car* (FOX; WEISBERG, 2018) e *nortest* (GROSS; LIGGES, 2015) para apurar a normalidade (Shapiro.test). Como houve uma distribuição normal de dados em todos os tempos analisados (p-value > 0.05), foi realizada uma análise de variância por meio de uma ANOVA *Oneway* e por meio do teste de *Tukey* foram realizadas comparações múltiplas entre o grupo controle o grupo exposto ao TMX.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração Letal Média (CL₅₀)

Foi utilizado o modelo binomial *logit* na interface RStudio do *software* estatístico R para análise dos dados de mortalidade encontrados após 24 horas de exposição das abelhas forrageiras de *F. varia* ao TMX. O valor obtido de CL₅₀ (24h) do TMX para a espécie *F. varia* foi de 0,6846 ng de i.a./μL, com intervalos de confiança (95%) de 0,6480 – 0,7219 ng de i.a./μL (Figura 6). A partir do valor encontrado de CL₅₀ (24h), foram calculados os valores de CL_{50/10} e CL_{50/100} para os bioensaios subsequentes, os quais foram: 0,068 e 0,0068 ng de i.a./μL, respectivamente.

Figura 6 – Concentração Letal Média (CL₅₀) de TMX encontrada para abelhas da espécie *F. varia* após 24 horas de exposição ao inseticida.



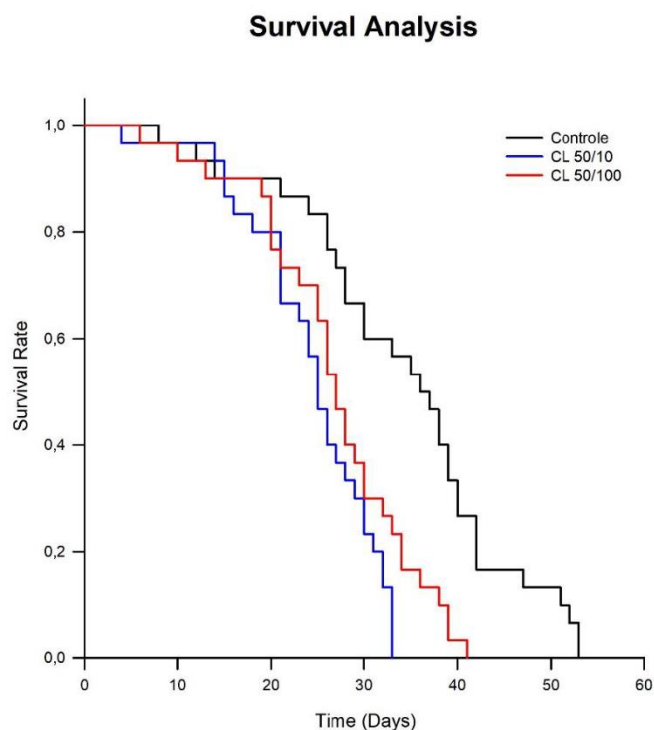
Fonte: elaborado pela autora (2022)

4.2 Tempo Letal Médio (TL₅₀)

As probabilidades de sobrevivência obtidas no bioensaio de TL₅₀ dos grupos experimentais foram: grupo controle – 37 dias, CL_{50/10} – 25 dias e CL_{50/100} – 27 dias (Figura 7). Quando comparadas as médias da TL₅₀, ambos os grupos expostos não apresentaram diferença significativa entre si ($p = 0,0725$), contudo, quando comparados individualmente com o grupo controle, ambas as concentrações subletais apresentaram diferença significativa em relação ao

controle. Os valores de p obtidos na comparação controle vs. $CL_{50/10}$ e controle vs. $CL_{50/100}$ foram $p=0,0000128$ e $p=0,000949$, respectivamente.

Figura 7 – Tempo Letal Médio (TL_{50}) de TMX encontrado para abelhas da espécie *F. varia* após exposição prolongada das concentrações subletais 0,068 e 0,0068 ng de i.a./ μ L do inseticida.



Fonte: elaborado pela autora (2022)

4.3 Atividade Enzimática

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de TL_{50} , os intervalos de dias para condução das análises de atividade enzimática foram determinados como um, cinco e dez. Dessa forma, cabeças e abdomens de *F. varia* foram extraídos, preparados e analisados no 1º, 5º e 10º dias de exposição à concentração subletal $CL_{50/10}$ de TMX. A atividade enzimática de AChE foi mensurada apenas nas cabeças uma vez que está envolvida com o mecanismo de ação do TMX, enquanto que CaE-3 e GST foram analisadas nas cabeças e abdomens devido ao fato dessas enzimas serem atuantes em ambos os órgãos (Figura 8).

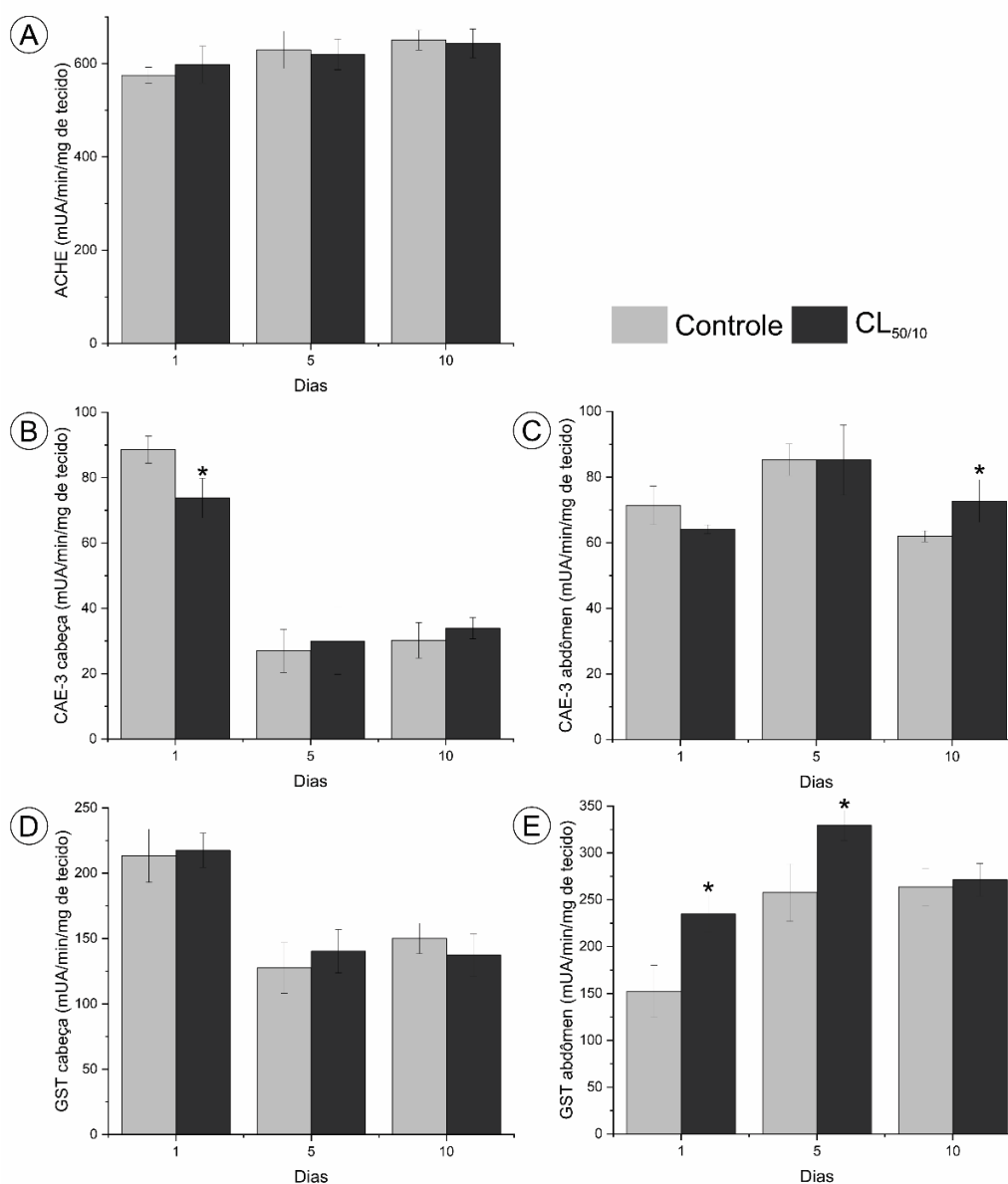
A atividade de AChE para o grupo controle em um, cinco e dez dias de exposição ao TMX foi $574,90 \pm 17,48$, $629,61 \pm 40,02$ e $650,44 \pm 21,24$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. Já para o grupo exposto ao TMX, a atividade enzimática de AChE foi $597,87 \pm 39,44$, $619,94 \pm 32,89$ e $643,45 \pm 30,75$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. Em

nenhum dos tempos em que AChE foi analisada houve diferença significativa entre os grupos controle e TMX (dia um: $p=0,836$; dia cinco: $p=0,864$; dia dez: $p=0,729$).

A atividade de CaE-3 (cabeças) para o grupo controle em um, cinco e dez dias de exposição ao TMX foi $88,61\pm4,16$, $26,98\pm6,63$ e $30,24\pm5,43$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. Já para o grupo exposto ao TMX, a atividade de CaE-3 foi $73,77\pm6,08$, $29,97\pm13,18$ e $33,93\pm3,23$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. CaE-3 (cabeças) apresentou diferença estatística significativa entre os grupos controle e TMX somente no primeiro dia de exposição ($p=0,002$), demonstrando valores de $p=0,690$ e $p=0,228$ para os dias cinco e dez, respectivamente. A atividade de CaE-3 (abdômens) para o grupo controle em um, cinco e dez dias de exposição ao TMX foi $71,42\pm5,85$, $85,29\pm4,81$ e $61,99\pm1,70$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. Já para o grupo exposto ao TMX, a atividade de CaE-3 foi $61,58\pm7,87$, $85,28\pm11,66$ e $72,72\pm6,46$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. CaE-3 (abdômens) apresentou diferença estatística significativa entre os grupos controle e TMX somente no décimo dia de exposição ($p=0,032$), demonstrando valores de $p=0,151$ e $p=0,999$ para os dias um e cinco, respectivamente.

A atividade de GST (cabeças) para o grupo controle em um, cinco e dez dias de exposição ao TMX foi $213,41\pm24,33$, $127,54\pm25,31$ e $150,13\pm11,60$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. Já para o grupo exposto ao TMX, a atividade de GST foi $217,54\pm13,14$, $140,33\pm16,63$ e $137,36\pm16,39$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. GST (cabeças) não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos controle e TMX em nenhum dos dias analisados, demonstrando valores de $p=0,310$, $p=0,373$ e $p=0,193$ para os dias um, cinco e dez, respectivamente. A atividade de GST (abdômens) para o grupo controle em um, cinco e dez dias de exposição ao TMX foi $152,42\pm27,81$, $257,67\pm37,66$ e $263,77\pm19,96$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. Já para o grupo exposto ao TMX, a atividade de GST foi $234,97\pm21,96$, $329,40\pm15,91$ e $271,28\pm17,36$ mUA/min/mg de tecido, respectivamente. GST (abdômens) apresentou diferença estatística significativa entre os grupos controle e TMX para os dias um e cinco ($p<0,001$ e $p=0,004$, respectivamente), demonstrando valor de $p=0,543$ para o dia dez.

Figura 8 – Atividade enzimática de AChE, CaE-3 e GST em *F. varia* para grupos controle e exposto à concentração subletal CL_{50/10} de TMX após um, cinco e dez dias de exposição. **A** – atividade enzimática de AChE em cabeças. **B** e **C** – atividade enzimática de CaE-3 em cabeças e abdômens, respectivamente. **D** e **E** – atividade enzimática de GST em cabeças e abdômens, respectivamente. As comparações estatísticas foram realizadas entre os grupos controle e exposto ao TMX, onde asteriscos (*) representam diferença significativa ($p = 0,05$).



Fonte: elaborado pela autora (2022)

5 DISCUSSÃO

O uso do inseticida TMX foi restrito em 2012 pela União Europeia em plantações que são atrativas para abelhas, e totalmente banido de todas as plantações agrícolas em 2018 (BASS; FIELD, 2018). No entanto, no Brasil o TMX ainda está sob reavaliação de risco pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (IBAMA, 2017), e desde então, são incentivadas pesquisas que auxiliem na compreensão do efeito dessa molécula em abelhas sem ferrão. Estudos realizados com a espécie modelo *A. mellifera* mostraram diferentes efeitos causados pelo TMX, utilizando as seguintes abordagens: estudos citotóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2013; CATAE *et al.*, 2014; TAVARES *et al.*, 2015; FRIOL *et al.*, 2017; MIOTELO *et al.*, 2021), perfil de expressão proteômico (ROAT *et al.*, 2020), *splicing* alternativo (DECIO *et al.*, 2019, 2021a), atividade enzimática (TAVARES *et al.*, 2017; DECIO *et al.*, 2021b), imuno-histoquímica (TAVARES *et al.*, 2019), dentre outros. Contudo, estudos com *F. varia* ainda são escassos e as lacunas de conhecimento em relação a essa espécie, seja biologia básica ou os efeitos causados pela exposição a agrotóxicos, ainda precisam ser melhor exploradas. Dessa forma, o presente estudo inova ao determinar a CL₅₀ e TL₅₀ do TMX para abelhas forrageiras da espécie *F. varia*, assim como a análise da atividade enzimática nas cabeças e abdomens trazem valiosas contribuições e avanços para os estudos com essa espécie. Os dados aqui apresentados podem contribuir para futuras reuniões e tomadas de decisões acerca dos efeitos do TMX sob agentes polinizadores e auxiliar com medidas protetivas.

O valor de CL₅₀ obtida para *F. varia* em 24 horas de exposição ao TMX (0,6846 ng i.a./μL) não difere tanto em relação à CL₅₀ (24 horas) da espécie *A. mellifera* encontrada para o mesmo inseticida, a qual foi 0,227 ng i.a./μL (MIOTELO *et al.*, 2021). Apesar de representar uma concentração baixa, o TMX é menos tóxico para *F. varia* do que para outras espécies de abelhas sem ferrão: *Melipona scutellaris* Latreille (0,0543 ng a.i./μL) (MIOTELO *et al.*, 2021), *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier (0,002 ng i.a./μL) (MOREIRA *et al.*, 2018) e *Tetragonisca angustula* Latreille (0,28 ng a.i./μL) (JACOB *et al.*, 2019). É válido ressaltar que, cada espécie de abelha irá apresentar um grau de sensibilidade à um determinado agrotóxico, o qual pode diferir a partir de fatores como: tamanho do corpo, idade, especialização floral, período de voo, modo de vida (social ou solitário) e comportamento do ninho (BRITTAIN; POTTS, 2011). Dessa forma, o fato de *F. varia* apresentar valor de CL₅₀ menos tóxico em relação às demais abelhas sem ferrão pode estar intimamente ligado à biologia e fisiologia da espécie ainda pouco explorada e reportada na literatura. Porém, A CL_{50/10} (68 ppb) e CL_{50/100} (6,8 ppb) utilizadas no presente estudo podem ser consideradas ambientalmente relevantes, uma vez que os resíduos

do TMX podem ser encontrados no pólen e néctar de culturas pulverizadas com o inseticida a níveis subletais, variando desde 1 a 53 ppb e 1 a 11 ppb, respectivamente (KRUPKE *et al.*, 2012; MULLIN *et al.*, 2010; PILLING *et al.*, 2013; STONER; EITZER, 2012).

Sabe-se que o TMX é uma molécula solúvel em água e que, devido a isso, é facilmente transportada para diferentes tecidos vegetativos e reprodutivos das plantas, podendo chegar ao pólen e néctar das flores (BASS; FIELD, 2018). O TMX possui quantidades conhecidas de resíduos em frutos e flores de culturas polinizadas por *F. varia*, os quais são: 0,06 mg/kg para algodão, 0,2 mg/kg para pimentão, girassol e abobrinha, e 1,0 mg/kg para tomate e citrus (ANVISA, 2019). Com isso é possível inferir que, apesar de *F. varia* ter apresentado um valor de CL₅₀ um pouco menos tóxica do que a da espécie modelo *A. mellifera*, ainda assim está sujeita a exposição de doses letais de TMX, que podem matá-las imediatamente em campo, ou concentrações subletais, que irão permitir seu retorno para a colônia resultando na contaminação de outros indivíduos (MIOTELO *et al.*, 2021). Além disso, apesar de pólen e néctar apresentarem níveis de resíduos inferiores se comparado com frutos, flores e folhas de suas respectivas plantas (PILLING *et al.*, 2013), o contato de abelhas com concentrações subletais de TMX pode acarretar efeitos subletais prejudiciais a esses indivíduos, como distúrbios nos sistemas neurológico e cognitivo e comportamentos anormais gerais e de forrageamento (LU *et al.*, 2020; PRADO *et al.*, 2020). Sendo assim, resíduos e concentrações subletais de agrotóxicos são fatores de risco não somente para as campeiras da espécie, mas também para toda a colônia que irá se alimentar de recursos trazidos do campo.

A TL₅₀ encontrada no presente estudo demonstrou que concentrações subletais de TMX podem ser prejudiciais à *F. varia*, uma vez que as concentrações subletais do inseticida causaram um encurtamento de 11±1 dias na expectativa de vida das abelhas. Os dados são alarmantes, uma vez que a espécie modelo *A. mellifera* não apresentou diferença significativa na expectativa de vida entre indivíduos do grupo controle (6 dias) e do grupo CL_{50/10} (5 dias), ambos expostos ao TMX (MIOTELO *et al.*, 2021). Ao comparar a TL_{50/10} de *A. mellifera* com *F. varia* (37 dias para o grupo controle e 25 dias para o grupo exposto), fica evidente que a exposição prolongada ao TMX é mais prejudicial para a abelha sem ferrão do que para a espécie modelo. Expandido as comparações para outras espécies, temos que a CL_{50/100} do TMX não influenciou o tempo de vida da abelha sem ferrão *M. scutellaris* (MIOTELO *et al.*, 2022) e nem de abelhas recém-emergidas da espécie *A. mellifera* (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Considerando que o presente estudo reporta alterações no tempo de sobrevivência de *F. varia* expostas a CL_{50/100}, esses dados enfatizam que a longo prazo o TMX é mais prejudicial para *F. varia*.

Moléculas de agrotóxicos que diminuem a expectativa de vida das abelhas representam um cenário preocupante. Por não causarem a morte imediata dos indivíduos no momento da exposição, as forrageiras retornam para a colônia levando consigo recursos contaminados (pólen, néctar, resina floral), o que propicia a chance de contaminação das demais abelhas da colônia, seja por meio do alimento contaminado ou a partir do próprio contato das forrageiras com outros indivíduos e/ou partes da colônia (MIOTELO et al., 2021). Dessa maneira, os indivíduos e recursos contaminados podem adoecer a colônia a tal ponto, que o resultado seja a morte da colmeia por completo. Assim, estabelecer as expectativas de vida de variadas espécies de abelhas expostas a diferentes moléculas é uma ferramenta extremamente útil, pois permite a compreensão das consequências dos agrotóxicos à nível populacional (WOLFF; REIS; SANTOS, 2008).

Analisar os efeitos que as concentrações subletais causam à nível do indivíduo também são fundamentais para elucidar em como os agrotóxicos afetam a homeostasia dos organismos das abelhas, e, conseqüentemente, a manutenção e sobrevivência da colônia como um todo (MEDRZYCKI et al., 2003). Nesse contexto, biomarcadores do tipo enzimático são ferramentas promissoras de análise de risco ambiental de agrotóxicos para as abelhas. Dessa forma, o presente estudo reporta análises no perfil enzimático de AChE, GST e CAE-3, exibindo resultados relevantes para o maior entendimento da relação entre o inseticida TMX e a espécie *F. varia*.

Os resultados obtidos para atividade de AChE demonstraram que não houve diferença significativa entre o grupo controle e o exposto em nenhum dos dias avaliados. Na literatura encontra-se resultados similares ao obtido no presente estudo, como no estudo de Badiou-Bénéteau e colaboradores (2012), no qual foi demonstrado que não houve diferença significativa na expressão de AChE de forrageiras de *A. mellifera* após 48 horas de exposição a doses subletais de TMX. No estudo de Decio et al. (2021a) foi avaliada a expressão de AChE em forrageiras de *A. mellifera* após cinco dias de exposição a dose CL_{50/10} de TMX, e também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos analisados. Tendo em vista que outros estudos também não obtiveram diferenças no perfil de expressão de AChE, os dados aqui apresentados são condizentes com a literatura. Além disso, não podemos nos basear apenas na ausência de alterações na modulação de AChE para concluir que o TMX não causa efeitos tóxicos, uma vez que Miotelo e colaboradores (2022) ressaltam que em *M. scutellaris*, o TMX afetou diferentes vias metabólicas que atuam em processos como: destoxificação, sinalização celular, estresse oxidativo, reparo de danos no DNA, etc. Estudos como esse evidenciam que a toxicidade de agrotóxicos pode ser mais complexa do que o esperado, acionando e/ou

interferindo em diferentes vias metabólicas essenciais para a sobrevivência das abelhas. Logo, a não detecção de efeitos tóxicos por um método não necessariamente nos proporciona uma perspectiva real do todo.

O TMX age como modulador competitivo do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), apresentando uma ação agonista, ou seja, é capaz de ligar-se aos nAChRs e ativá-lo, de forma similar a ação biológica normal realizada pela ACh (LEWIS, 2016; TOMIZAWA; CASIDA, 2002). Sabe-se que o TMX possui uma IC_{50} (parâmetro utilizado para descrever a quantidade necessária de uma substância para inibir em 50% um processo ou componente biológico) de 5.000 nM para moscas domésticas, enquanto outros inseticidas do grupo dos neonicotinóides apresentam IC_{50} com valores muito mais baixos, como o Acetamiprid (8,3 nM), o Imidacloprid (4,3 nM) e a Clotianidina (2,2 nM) (TOMIZAWA; CASIDA, 2011). Considerando que esse efeito também pode ocorrer com abelhas, talvez seja necessário que um indivíduo entre em contato com uma concentração de TMX mais alta do que a utilizada no presente estudo, para que então possa causar inibição de processos biológicos nos receptores nicotínicos. Uma vez que foi utilizada uma concentração subletal de TMX durante um período mais curto que o TL_{50} do inseticida encontrado para a espécie, é possível que a quantidade de TMX ligante aos nAChRs durante o bioensaio não tenha sido suficiente para ativar a modulação de AChE.

Thany (2010) reportou que o genoma de *A. mellifera* possui de 10 a 12 genes codificadores de subunidades de nAChRs, os quais podem existir como homômeros ou heterômeros de diferentes subunidades ou, mais frequentemente, como combinações dessas subunidades de nAChRs. A diversidade nos tipos de receptores nicotínicos pode contribuir para uma sensibilidade diferencial e maior resiliência das abelhas à exposição dos inseticidas neonicotinóides. Dessa forma, assim como reportado para abelhas melíferas, indivíduos de *F. varia* também podem apresentar diferentes genes codificadores de nAChRs, e consequentemente serem capazes de efetuar diferentes arranjos de subunidades para formar nAChRs, o que poderia acarretar na autorregulação do metabolismo celular em resposta aos receptores ocupados pelo TMX.

Em uma revisão sobre neonicotinóides publicada por Bass e Field (2018) é relatada a existência de dois tipos de mecanismos de resistência metabólica a esses inseticidas em diferentes tipos de insetos. A primeira é denominada de resistência metabólica, a qual é mediada por um aumento da atividade e/ou expressão de enzimas, como as do citocromo P450, as quais irão degradar os neonicotinóides antes que eles possam interagir com os nAChRs. Já a segunda é denominada de resistência do sítio-alvo, e é causada por mutações nos receptores nicotínicos

que resultam em uma redução de sensibilidade aos neonicotinóides. Essas mutações tornam o receptor mais parecido com o de humanos e outros vertebrados e, assim, conferem maior resistência dos insetos à essa classe de inseticida. Apesar desses mecanismos de resistência metabólica não terem sido descritos especificamente para as abelhas sem ferrão, é possível que diferentes espécies possam ter desenvolvido mecanismos de resistência idênticos ou similares, incluindo *F. varia*.

Apesar de no presente estudo não ter sido encontrado aumento ou diminuição na expressão de AChE do grupo exposto ao TMX em relação ao grupo controle, aplicar outras abordagens pode ajudar na compreensão dos efeitos do inseticida no cérebro de *F. varia* e de outras espécies de abelhas. Como o TMX age competindo com ACh para ligar-se aos nAChRs, é possível que haja acúmulo de ACh nas fendas sinápticas após o inseticida realizar a ligação com os receptores nicotínicos, resultando em uma hiperestimulação colinérgica e, consequentemente, na paralisia e morte dos indivíduos (SILVA, 2012). Dessa forma, compreender a reação do neurotransmissor na presença de TMX pode ser um ponto chave no entendimento da toxicidade do TMX às abelhas.

Os resultados encontrados para CaE-3 mostram que houve um decréscimo na expressão dessa enzima no primeiro dia de exposição (cabeças) e aumento da expressão no décimo dia de exposição (abdomens). Os dados obtidos para as cabeças de *F. varia* são similares aos encontrados para CaE-3 em cabeças de *A. mellifera* expostas ao TMX em um, três e cinco dias de análise, e em destaque, a diminuição de expressão no primeiro dia de exposição (DECIO *et al.*, 2021a). Esse perfil de inibição enzimática causada pelo TMX também foi reportado em outros estudos presentes na literatura (YU *et al.*, 1984; BADIOU-BÉNÉTEAU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017). Já para abdomens de *F. varia*, o aumento da expressão no último dia de exposição difere do encontrado por Decio e colaboradores (2021a) para a espécie *A. mellifera*, a qual demonstrou diminuição significativa na expressão de AChE em cinco dias de exposição ao TMX. Além disso, é válido ressaltar que nenhum desses estudos analisou alterações no perfil enzimático após o quinto dia de exposição ao TMX, não sendo possível fazer comparações entre os dados presentes na literatura e os dados reportados para CaE-3 no presente estudo (dia 10).

Carboxilesterases são esterases que desempenham um papel fundamental na destoxificação de compostos orgânicos, atuando na hidrólise de agentes químicos, convertendo-os em metabólitos não tóxicos (TOMAZETTI, 2017). São classificadas como enzimas de fase I, e os produtos de sua reação de hidrólise podem ser transformados posteriormente por enzimas de fase II, ou excretados de forma direta (GREIN; SNYDER,

2008). CaE-3 não demonstrou atividade significativa na destoxificação de TMX em cabeças de *F. varia* (cinco e 10 dias), e nas análises de um e cinco dias em abdomens da espécie, o que sugere que outras enzimas destoxicantes possam ter participado desse processo. Badiou-Bénéteau e colaboradores (2012) demonstraram em seus estudos que concentrações subletais de agrotóxicos podem aumentar a atividade de CaE-2 e inibir a atividade de CaE-1 e CaE-3, o que pode ser um indicativo da razão de CaE-3 não ter participado na excreção de TMX durante a primeira metade do tempo analisado. Em contrapartida, o acúmulo de TMX no organismo de *F. varia* (mesmo que em concentração subletal), tornou necessária a destoxificação dessa molécula, sendo demonstrada pela maior expressão de CaE-3 no décimo dia de análise em abdomens da espécie.

É válido ressaltar que a capacidade de maior expressão de diferentes tipos de Carboxilases, sem acarretar prejuízos ao metabolismo, pode conferir ao indivíduo uma maior resistência a outros agrotóxicos além dos neonicotinóides, como os piretróides, organofosforados e carbamatos (PAULINO, 2008). Dessa forma, compreender as relações entre as Carboxilesterases em diferentes espécies na presença de diferentes tipos de agrotóxicos pode contribuir para análises mais aprofundadas de avaliação de risco para abelhas.

Os dados obtidos para GST em cabeças de *F. varia* não apresentaram diferença significativa em nenhum dos períodos analisados. Já para abdomens, foi notável a maior expressão de GST no grupo exposto ao TMX, apresentando picos de expressão com diferença significativa no primeiro e quinto dia de exposição ao TMX. Diferentes estudos na literatura reportaram aumento de expressão de GST em intestinos de *A. mellifera* para diferentes moléculas de inseticidas: TMX (BADIOU-BÉNÉTEAU *et al.*, 2012), Imidacloprid (LI *et al.*, 2017), Espinosade (CARVALHO *et al.*, 2013), e Permetrina (YU; ROBINSON; NATION., 1984). Li e colaboradores (2017) também encontraram crescente aumento na expressão de GST em indivíduos de *A. cerana* expostos à Clotianidina. A partir disso, é possível notar que, assim como para espécies melíferas, a enzima GST também foi fundamental para *F. varia* no processo de destoxificação metabólica na presença de inseticidas, em particular, neonicotinóides.

GST é uma enzima de fase II envolvida no processo de destoxificação celular de compostos eletrofílicos, isto é, moléculas com capacidade de receber carga negativa (elétrons) encontradas na forma de xenobióticos (TORRES; SOARES; PEREIRA, 2006). Além disso, GST também atua contra espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e contra o estresse oxidativo, tendo papel fundamental na proteção das células, material genético e integridade das proteínas (BARATA *et al.*, 2005; SRINIVAS *et al.*, 2019). Como no presente estudo encontrou-se notável participação de GST em abdomens de *F. varia*, pode-se inferir que

os esforços para destoxificação metabólica se iniciaram intensivamente nos órgãos digestivos, a fim de evitar que danos maiores fossem causados em tecidos cerebrais dos indivíduos. Apesar do cérebro ser o alvo principal dos neonicotinóides, durante a exposição oral outros órgãos podem ser afetados, como o intestino e túbulos de Malpighi, sendo o intestino a primeira via afetada pelos agrotóxicos (MIOTELO *et al.*, 2021; CATAE *et al.*, 2014; FRIOL *et al.*, 2017). Dessa forma, tendo em mente que os dados são relativos à uma concentração subletal de TMX, é possível que GST tenha despendido grandes esforços em combater o TMX ainda na via digestiva, havendo pouca necessidade de grandes expressões nas cabeças de *F. varia*, ou que outras enzimas destoxificantes tenham agido no tecido cerebral dos indivíduos.

De modo geral, os neonicotinóides induzem respostas imunes distintas a depender da espécie analisada, e ainda, como abordado anteriormente, pode variar entre os ingredientes ativos dessa mesma classe (BADIOU-BÉNÉTEAU *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2017). Dessa forma, é possível que outras enzimas destoxificantes importantes não incluídas neste estudo também tenham participado no processo de respostas ao TMX, como Citocromo P450s, catalases e *AmNOS*. Além disso, é reportado na literatura que o TMX altera fisiologicamente órgãos não-alvo que não foram abordados no presente estudo, como túbulos de Malpighi (MIOTELO *et al.*, 2021). Com isso, é válido ressaltar que, apesar de ter sido possível demonstrar a ação tóxica de TMX por meio do perfil de alta resposta de GST em abdomens de *F. varia* (mesmo na presença de uma concentração subletal), novas abordagens com diferentes combinações de agrotóxicos e espécies de abelhas podem ser realizadas a fim de enriquecer os dados acerca da preservação desses polinizadores.

6 CONCLUSÃO

Ao determinar a CL_{50} do inseticida TMX para abelhas campeiras da espécie *F. varia*, foi obtida uma concentração menos tóxica para a espécie de abelha sem ferrão do que para a espécie modelo *A. mellifera*. No entanto, a diferença entre ambas as concentrações é muito baixa (aproximadamente 0,4 ng i.a./ μ L de diferença) e ainda configura uma concentração ambientalmente relevante. Além disso, devido às altas doses residuais de TMX encontradas nas culturas polinizadas por *F. varia*, a exposição de forrageiras da espécie ainda é preocupante. Nesse contexto, a expectativa de vida de *F. varia* teve queda considerável após a exposição a duas concentrações subletais de TMX. Esse fato representa um fator de risco para *F. varia*, por inferir que forrageiras previamente expostas ao TMX possam retornar para suas colônias com recursos contaminados e rapidamente infectar e comprometer toda a colmeia. Além disso, os resultados enzimáticos demonstram que, apesar de AChE ser parte do mecanismo alvo do TMX nos insetos, esta parece não ser modulada positiva ou negativamente na presença do neonicotinóide. CaE-3, por sua vez, apresentou inibição enzimática no primeiro dia em cabeças, e maior expressão enzimática no décimo dia em abdomens de *F. varia*. Porém, devido à baixa participação de CaE-3 nos demais dias de análise, é possível que outras carboxilesterases tenham tido maior participação no processo de destoxificação, como CaE-2. Por fim, GST apresentou picos de expressão nos dias um e cinco de exposição em abdomens de *F. varia*, demonstrando alta performance na destoxificação das concentrações subletais de TMX, revelando ser uma importante enzima de atuação na presença de xenobióticos para a espécie. Apesar disso, utilizar outras enzimas ou abordagens, como expressão gênica diferencial, pode representar valiosas tentativas para compreender e aprofundar os conhecimentos em relação a toxicidade do TMX, sendo possível acessar processos celulares ou vias metabólicas que estão sendo comprometidas. Considerando que pouco se sabe sobre *F. varia* e que as avaliações de risco para agrotóxicos não deveriam ser baseadas apenas na espécie modelo *A. mellifera*, o presente estudo contribui significativamente com informações adicionais e evidências sobre a toxicidade do TMX em uma espécie de abelha sem ferrão.

REFERÊNCIAS

ALMASRI H. *et al.* Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 1110–1113, 2020.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 6. n. 2., p. 158–170, 2003.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico: T-48 Tiametoxam**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/t/4551json-file-1/view>>. Acesso em: 15 abr. 2022.

ASSAD, M. L. L.; ALMEIDA, J. Agricultura e Sustentabilidade: Contexto, Desafios e Cenários. **Ciência & Ambiente**, v. 29. p. 15–30, 2004.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A. *et al.* Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 22–31, 2012.

BANDA, H. J.; PAXTON, R. J. Pollination of Greenhouse Tomatoes By Bees. **Acta Horticulturae**, v. 288, p. 194–198, 1991.

BASS, C.; FIELD, L. M. Neonicotinoids. **Current Biology**, v. 28, R772–R773, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.061>>.

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.

BARATA, C. *et al.* 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.

BOYLE, N. K. *et al.* Workshop on Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Non-Apis Bees: Foundation and Summaries. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 4–11, 2019.

BRITTAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, v. 12, n. 4, p. 321–331, 2011.

CARVALHO, S. *et al.* Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 597–606, 2009.

CARVALHO, S. *et al.* Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, p. 2117–2124, 2013.

CATAE, A. F. *et al.* Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, p. 274–281, 2014.

CHAM, K. O. *et al.* **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. 2. ed. Brasília: IBAMA/Diqua, 2017.

CHAM, K. O.; SILVA, F. E. C.; OLIVEIRA, R. P. **Avaliação de risco de agrotóxicos para insetos polinizadores e lacunas de conhecimento**. 2017. Disponível em: <<http://apacame.org.br/site/revista/mensagem-doce-n-140-marco-de-2017/nota-tecnica/>>. Acesso em: 1 abr. 2022.

CHAM, K. O., *et al.* Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 36–48, 2019.

COUVILLON, M. J.; RATNIEKS, F. L. W. Odour transfer in stingless bee marmelada (*Frieseomelitta varia*) demonstrates that entrance guards use an “undesirable-absent” recognition system. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 62, n. 7, p. 1099–1105, 2008.

DECIO, P. *et al.* Acute thiamethoxam toxicity in honeybees is not enhanced by common fungicide and herbicide and lacks stress-induced changes in mRNA splicing. **Scientific Reports**, v. 9, 2019. <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55534-8>>.

DECIO, P. *et al.* Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 223, 2021a. <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112581>>.

DECIO, P. *et al.* Thiamethoxam exposure deregulates short ORF gene expression in the honey bee and compromises immune response to bacteria. **Scientific Reports**, v. 11, 2021b. <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-80620-7>>.

DOS REIS, A. L. M. **Toxicidade do Tiametoxam e seus Efeitos Subletais em Campeiras de *Apis mellifera* Africanizada Lineu, 1758 (Hymenoptera, Apidae)**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2017.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 7, p. 88–95, 1961.

FAIRBROTHER, A. *et al.* Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 719–731, 2014.

FAO. Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - the international response. In: Freitas, B.M.; Pereira, J.O.P. (eds.) **Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination**. Imprensa Universitária. Fortaleza, Brasil. p. 19–2. 2004.

FORD, K. A.; CASIDA, J. E. Comparative metabolism and pharmacokinetics of seven

neonicotinoid insecticides in spinach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10168–10175, 2008.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An R companion to applied regression**. 3. ed. Thousand Oaks: Sage, 2018.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A importância econômica da polinização. **Mensagem Doce**, v. 80, n. 1987, p. 44–46, 2005.

FRIOL, P. S. *et al.* Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56–66, 2017.

GIANNINI, T. C. *et al.* The Dependence of Crops for Pollinators and the Economic Value of Pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 849–854, 2015.

GREIN, H.; SNYDER, R. **Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction**. 1. ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2008. 677 p.

GROSS, J.; LIGGES, U. **Nortest: Tests for Normality. R package version**. 2015.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). **Nota técnica sobre avaliação de risco de agrotóxicos para insetos polinizadores e lacunas de conhecimento**. Brasília, 2017.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. *et al.* **Polinizadores no Brasil: Contribuição e Perspectivas para a Biodiversidade, Uso Sustentável, Conservação e Serviços Ambientais**. São Paulo: Instituto de Estudos Avançados da Universidade Estadual Paulista, 2011. 488 p.

JACOB, C. R. *et al.* The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 224, p. 65–70, 2019.

KAPLAN, E. L.; MEIER, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American Statistical Association**, v. 53, n. 282, p. 457–481, 1958.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W.; WASER, N. M. Endangered mutualisms: The conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 83–112, 1998.

KEVAN, P. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2002. 313 p.

KLEIN, A. *et al.* **Insect Pollination of Crops in Brazil**. Albert-Ludwigs University Freiburg: Friburgo. 2020. 162 p.

KRUPKE, C. H. *et al.* Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2012.

LEWIS, K. A. *et al.* **PPDB: Pesticide Properties DataBase**, 2016. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/631.htm>>. Acesso em: 17 de set. de 2022.

LI, Z. *et al.* Differential physiological effects of neonicotinoid insecticides on honey bees: A comparison between *Apis mellifera* and *Apis cerana*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 140, p. 1–8, 2017.

LU, C.; HUNG, Y. T.; CHENG, Q. A Review of Sub-lethal Neonicotinoid Insecticides Exposure and Effects on Pollinators. **Current Pollution Reports**, v. 6, p. 137–151, 2020.

MALERBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Honey bee attractants and pollination in sweet orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, var. Pera-Rio. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 144–153, 2004.

MEDRZYCKI, P. *et al.* Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 59–62, 2003.

MIOTELO, L. **Proteção de polinizadores: toxicidade do tiametoxam para *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 2017. 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2017.

MIOTELO, L. *et al.* *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, v. 268, 2021.
<<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115770>>.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. **Half-normal plots and overdispersed models in R: The hnp package**, 2017.

MOREIRA, D. R. *et al.* Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 33, p. 463–175, 2018.

MOTA, W. M. *et al.* Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 4, p. 624–628, 2012.

MULLIN, C. A. *et al.* High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. 1–19, 2010.

NUNES, T. M. *et al.* Nestmate recognition in a stingless bee: does the similarity of chemical cues determine guard acceptance? **Animal Behaviour**, v. 75, n. 3, p. 1165–1171, 2008.

OECD. Test No. 213: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. p. 1–8, 1998a.

OECD. Test No. 214: Honeybees, Acute Oral Toxicity Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. p. 1–7, 1998b.

OLIVEIRA, D. M. **Atividade quimiossensibilizante e antitumoral in vitro do 8-metoxipsoraleno, um novo inibidor da glutathione S-transferase- π** . Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

OLIVEIRA, R. A. *et al.* Side-Effects of Thiamethoxam on the Brain and Midgut of the Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 1122–1133, 2013.

PAULINO, R. M. **Caracterização molecular e bioquímica de uma esterase macho-específica em *Zaprionus indianus***. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, 2008.

PILLING, E. *et al.* 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, n. 1, p. 1–14, 2013.

PIRES, C. S. S.; TOREZANI, K. R. S. **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente (IBAMA), 2018.

POTTS, S. G. *et al.* Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345–353, 2010.

PRADO, F. S. R. *et al.* Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille (1811) via oral and topic acute exposure. **Environmental Pollution**, v. 265, 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114313>>.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2018.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2014. 876 p.

RECH, A. R. **Biologia da Polinização**. 1. ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 2014. 572 p.

ROAT, T. C. *et al.* Using a toxicoproteomic approach to investigate the effects of thiamethoxam into the brain of *Apis mellifera*. **Chemosphere**, v. 258, p. 1–13, 2020.

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

ROUBIK, D. W. **The pollination of cultivated plants: A compendium for practitioners**. 2. ed. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2018. 266 p.

SBORDONI, Y. S. R. **Termorregulação em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): produção ativa de calor e metabolismo energético**. 2015. 109 p. Tese

(Doutorado em Entomologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

SILVA, K. C. C. **Caracterização da Acetilcolinesterase cerebral de tucunaré, *Cichla ocellaris* (BLOCH & SCHNEIDER, 1801): efeito de íons e pesticidas organofosforados e carbamatos sobre sua atividade**. 2012. 78 f. Dissertação (mestrado) - UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SRINIVAS, U. S. *et al.* ROS and the DNA Damage Response in Cancer. **Redox Biology**, v. 25, 2019. < <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>>.

STONER, K. A.; EITZER, B. D. Movement of Soil-Applied Imidacloprid and Thiamethoxam into Nectar and Pollen of Squash (*Cucurbita pepo*). **PLoS One**, v. 7, n. 1, p. 1–5, 2012.

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

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

TAVARES, D. A. *et al.* Exposure to thiamethoxam during the larval phase affects synapsin levels in the brain of the honey bee. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 169, p. 523–528, 2019.

THANY S. H. Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 3365–3371, 2006.

TOMAZETTI, D.; SILVA, L. O.; TUERLINCKX, S. Determinação da Enzima Carboxilesterase na Avaliação do Impacto de Cinzas Volantes da Gaseificação do Carvão Sobre a Oligoqueta *Eisenia Foetida*. Urcamp. **Anais**. Bagé: 14ª Mostra de Iniciação Científica Congrega, 2017.

TOMIZAWA M.; CASIDA J. E. Desnitro-imidacloprid activates the extracellular signal-regulated kinase cascade via the nicotinic receptor and intracellular calcium mobilization in N1E-115 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 184, p. 180–186, 2002.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid Inseticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 247–268, 2005.

TOMIZAWA M.; CASIDA J. E. Unique neonicotinoid binding conformations conferring selective receptor interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2825–2828, 2011.

TORRES, M. C. L.; SOARES N. F. F.; PEREIRA J. A. M. Extração, Purificação e Avaliação da Atividade da Glutathione S-Transferase de Fígado Bovino. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 2, p. 302–307, 2006.

TURNER J. A. **The Pesticide Manual: A World Compendium**. 17. ed. UK: British Crop Production Council, 2015. 1440 p.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S. - Statistics and Computing**. 4. ed. Nova York: Springer, 2002. 497 p.

WALKER, C. H. *et al.* **Principles of Ecotoxicology**. 4. ed. London: Francis & Taylor, 2012. 386 p.

WITTER, S.; BLOCHTEIN, B. Efeito da polinização por abelhas e outros insetos na produção de sementes de cebola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 12, p. 1399–1407, 2003.

WOLFF, L. F.; REIS, V. D.; SANTOS, R. S. S. **Abelhas melíferas: bioindicadores de qualidade ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica**. Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E). 1. ed. 2008.

WOLOWSKI, M. *et al.* Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil. **Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos**, 2019. 93 p. Disponível em: < https://www.bpb.es.net.br/wp-content/uploads/2019/03/BPBES_CompletoPolinizacao-2.pdf > Acesso em: 15 mai. 2022.

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.