

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 06/12/2024.

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

**Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e
melíferas ao flupiradifurona**

ADNA SUELEN DORIGO

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

**Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e
melíferas ao flupiradifurona**

ADNA SUELEN DORIGO

Orientador: Prof. Dr. Osmar Malaspina

Coorientadoras: Prof^a. Dr^a. Roberta C. Ferreira Nocelli e Dr^a. Annelise de Souza Rosa-Fontana

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

D697a Dorigo, Adna Suelen
Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e melíferas ao flupiradifurona / Adna Suelen Dorigo. -- Rio Claro, 2022
93 p.

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

1. Larvas de abelhas. 2. Biologia Molecular. 3. Biologia Celular. 4.
Ecotoxicologia. 5. Stingless bees. 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.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Avaliação de efeitos da exposição oral de abelhas sem ferrão e melíferas ao flupiradifurona

AUTORA: ADNA SUELEN DORIGO

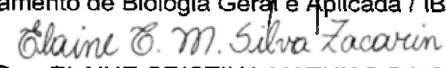
ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA

COORIENTADORA: ANNELISE DE SOUZA ROSA FONTANA

COORIENTADORA: ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas, área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. OSMAR MALASPINA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro


Profa. Dra. ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)


Prof. Dr. JOSÉ BRUNO MALAQUIAS (Participação Virtual)
Centro de Ciências Agrárias / Universidade Federal da Paraíba - UFPB


Profa. Dra. LETÍCIA ROCHA GONÇALVES (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Rio Claro, 06 de dezembro de 2022

***Aos meus pais, que sempre me apoiaram e me
deram suporte para ir atrás dos meus sonhos.***

Agradecimentos

Agradeço à Deus pelo dom da vida e por ter me permitido realizar este trabalho;

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, pela lição de otimismo e determinação; sem vocês eu não teria chegado até aqui. Vocês têm todo meu amor, admiração e respeito.

À minha irmã Lilian e cunhado Marcos, pela amizade e generosidade, pelo companheirismo em todos os momentos;

Ao meu namorado Tiago, por sua amizade, apoio, paciência e motivação;

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela disposição em me orientar, por todo apoio e incentivo;

A minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Roberta pela oportunidade, amizade, incentivo, dedicação, paciência e atenção prestados; muito obrigada por me acolher e me fazer amar a ciência. Você sempre foi uma inspiração para mim. Minha primeira mãe-científica;

A minha coorientadora e amiga Dr^a. Annelise pela amizade, orientação, ajuda, paciência e conselhos sempre úteis quando eu estava em dúvida de qual caminho seguir. Obrigada pela amizade e companheirismo; espero que ainda viajemos muito juntas para aumentarmos nossas histórias malucas. Minha segunda mãe-científica;

À Tatiane Grella por toda amizade e companheirismo em todos os anos de pós-graduação; que a nossa amizade cresça a cada dia. Sem sua ajuda nada disso seria possível!

Ao Iago Bueno por sempre estar comigo quando precisei, por me ouvir e me ajudar;

A Ingrid por ser muito mais que uma prima, por ser minha amiga! Por sempre torcer por mim, sempre me ouvir e estar ao meu lado.

À Daiana Tavares por ter me ensinado as técnicas enzimáticas utilizadas neste trabalho, pelas discussões de resultados e pelos momentos de risada.

A todos do grupo do LECA (Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas), em especial a Pamela Decio, Nicole Butolo, Lucas Miotelo, Geovana Maloni e Isabella Camargo pelas risadas, parcerias, discussões e risadas, tudo isso ficará na memória.

A minha aluna de iniciação científica Daniela Simões, foi prazer trabalhar com você.

A minha amiga Mirian, por sua amizade de anos, sempre me incentivando e torcendo por mim, mesmo estando 3.000 km de distância.

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

Ao técnico Sérgio Pascon por todos seus ensinamentos;

À Necis Miranda por me socorrer sempre que precisei; vou sentir falta de te falar bom dia todos os dias 7h da manhã. rs

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal, assim como para a realização deste trabalho.

Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Departamento de Biologia, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, pela concessão de espaço para execução dessa pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Realizar esse trabalho em tempos sombrios de pandemia não foi uma tarefa fácil, mas com a ajuda de todos consegui chegar até aqui. Obrigada a cada um que sempre esteve ao meu lado e me deram apoio/suporte para conseguir caminhar. Agora a jornada é outra!

*On ne voit bien qu'avec le cœur.
L'essentiel est invisible pour les yeux.
Saint-Exupéry – Le petit Prince*

Resumo

O atual cenário brasileiro de uso de agrotóxicos nos sistemas agrícolas, somado à necessidade do estabelecimento de políticas públicas de proteção a polinizadores, requer estudos sobre os potenciais efeitos destes produtos químicos sobre organismos não-alvo. Além de se avaliar as taxas de mortalidade, é essencial que possíveis efeitos subletais sejam considerados. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos: (i) compreender os possíveis efeitos subletais do inseticida flupiradifurona em larvas de abelhas *Apis mellifera*, *Melipona scutellaris* e *Scaptotrigona postica* expostas oralmente. (ii) analisar a atividade de biomarcadores enzimáticos em larvas expostas a doses realistas de campo do inseticida flupiradifurona. (iii) avaliar o impacto da exposição do flupiradifurona na fase larval e em abelhas recém-emergidas sobre o sistema imune das abelhas, por meio da contagem de hemócitos. Para tanto, (i) larvas das espécies *A. mellifera*; *S. postica* e *M. scutellaris* foram expostas ao inseticida Flupiradifurona (grupo D - 0,77 ng i.a/μL de alimento; grupo DC 7,7 ng i.a/μL de alimento). Foram observados os efeitos de acordo com a progressão das fases de desenvolvimento: 5ª instar larval; defecação; taxa de mortalidade; taxa de pupação; taxa de emergência; mudança na coloração de olhos das pupas e; tempo em cada fase de desenvolvimento. Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas no software RStudio. Os resultados demonstraram que o flupiradifurona afetou significativamente todos os parâmetros larvais em ambos os grupos expostos, quando comparados ao controle demonstrando que o flupiradifurona pode ser considerada tóxica para abelhas em sua fase de desenvolvimento. (ii) larvas das espécies *A. mellifera*; *S. postica* e *M. scutellaris* foram expostas ao inseticida Flupiradifurona (grupo D - 0,77 ng i.a/μL de alimento; grupo DC 7,7 ng i.a/μL de alimento) e 15 delas foram coletadas 24 horas após o término da alimentação. Foram realizadas a modulação da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GP), carboxilesterase (CaEs p), glicose-6- fosfato desidrogenase (G6PDH), glutathione s- transferase (GST), glicose oxidase (GOX), fenol oxidase (POX) e fosfatase alcalina (PAL). Os resultados mostraram sua eficácia na identificação de efeitos subletais, apontando diferentes respostas da exposição para as espécies de abelhas analisadas. Dessa forma, o uso dessas ferramentas moleculares demonstra grande potencial para serem incluídas em futuras decisões de órgãos regulatórios para análise de risco. (iii) larvas das espécies *A. mellifera*; *S. postica* e *M. scutellaris* foram expostas ao inseticida Flupiradifurona (grupo D - 0,77 ng i.a/μL de alimento; grupo DC 7,7 ng i.a/μL de alimento) e para este teste foram coletadas larvas 24 horas após o término da alimentação e abelhas recém-emergidas (24 horas após a emergência). Foi coletada

a hemolinfa desses indivíduos e adicionado ao corante azul de metileno para visualização em microscópio eletrônico. Através de análises estatísticas podemos inferir que o uso de flupiradifurona pode comprometer o sistema imune dessas abelhas, podendo levar a morte tanto do indivíduo quanto da colônia. Os resultados obtidos são inéditos e contribuem para o desenvolvimento de medidas protetivas para a conservação das espécies *A. mellifera*, *S. postica* e *M. scutellaris*, uma vez que este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da exposição larval ao flupiradifurona para essas espécies. Desse modo, esse trabalho fornece dados pioneiros para a literatura científica, com relevância a serem incluídos nas avaliações de risco ambientais realizadas pelo IBAMA.

Palavras-Chave: agrotóxico; *in vitro*; avaliação de risco; polinizadores

Abstract

The current Brazilian scenario of pesticide use in agricultural systems, added to the need to establish public policies to protect pollinators, requires studies on the potential effects of these chemicals on non-target organisms. In addition to assessing mortality rates, it is essential that possible sublethal effects are considered. Thus, the present study aimed to: (i) Understand the possible sublethal effects of the insecticide flupyradifurone on *Melipona scutellaris* and *Scaptotrigona postica* bee larvae through a comparison with the orally exposed *Apis mellifera* species; (ii) To analyze the activity of enzyme biomarkers in larvae exposed to realistic field doses of the insecticide flupyradifurone; (iii) To evaluate the impact of flupiradifurone exposure in the larval stage and in newly emerged bees on the bee's immune system, through hemocyte count. For this purpose, (i) larvae of the species *A. mellifera*; *S. postica* and *M. scutellaris* were exposed to the insecticide flupyradifurone (group D - 0.77 ng a.i./ μ L of food; group DC 7.7 ng a.i./ μ L of food). The effects were observed according to the progression of the development stages: 5th larval instar; defecation; mortality rate; pupation rate; emergency fee; change in pupae eye color and; time at each stage of development. The data obtained were submitted to statistical analysis in the RStudio software. The results showed that flupiradifurone significantly affected all larval parameters in both exposed groups, when compared to the control, demonstrating that flupiradifurone can be considered toxic to bees in their development phase. (ii) larvae of *A. mellifera* species; *S. postica* and *M. scutellaris* were exposed to the insecticide flupyradifurone (group D - 0.77 ng a.i./ μ L of food; group DC 7.7 ng a.i./ μ L of food) and 15 of them were collected 24 hours after the end of feeding. Modulation of the enzymatic activity of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GP), carboxylesterase (CaEs p), glucose -6- phosphate dehydrogenase (G6PDH), glutathione s-transferase (GST), glucose oxidase (GOX), phenol oxidase (POX) and alkaline phosphatase (PAL). The results showed its effectiveness in the identification of sublethal effects, pointing out different exposure responses for the analyzed bee species. Thus, the use of these moleculares tools demonstrates great potential to be included in future decisions of regulatory bodies for risk analysis. (iii) larvae of *A. mellifera* species; *S. postica* and *M. scutellaris* were exposed to the insecticide flupyradifurone (group D - 0.77 ng a.i./ μ L of food; group DC 7.7 ng a.i./ μ L of food) and larvae were collected 24 hours after the end of the experiment. feeding and newly emerged bees (24 hours after emergence). Hemolymph from these individuals was collected and added to methylene blue dye for visualization under an electron microscope. Through statistical analysis we can infer in this study that the use of

flupiradifurone can compromise the immune system of these bees, which can lead to the death of both the individual and the colony. The results obtained are unprecedented and contribute to the development of protective measures for the conservation of the species *A. mellifera*, *S. postica* and *M. scutellaris*, since this study is the first to assess the effects of larval exposure to flupiradifurone for these species. In this way, this work provides pioneer data for the scientific literature, being relevant to be included in the environmental risk assessments carried out by IBAMA.

Keywords: pesticide; *in vitro*; risk assessment; pollinators

Sumário

Introdução geral	14
Objetivos e organização geral da tese.....	18
Referências	19
Capítulo 1	22
1. Introdução.....	22
2. Materiais e Métodos.....	26
Coleta do material biológico para bioensaios in vitro	26
Obtenção das concentrações realistas de campo para o Flupiradifurona	27
Bioensaios in vitro com <i>Apis mellifera</i>	27
Bioensaios in vitro com espécies sem ferrão: <i>Melipona scutellaris</i> e <i>Scaptotrigona postica</i>	29
Análises estatísticas	30
3. Resultados e Discussão	31
Taxas de mortalidade e desenvolvimento	31
Tempo de desenvolvimento	36
4. Conclusão	39
5. Referências:.....	39
Capítulo 2	48
1. Introdução:.....	48
2. Materiais e Métodos.....	53
Coleta do material biológico para bioensaios in vitro	53
Obtenção das concentrações realistas de campo para o Flupiradifurona	53
Bioensaios in vitro com <i>Apis mellifera</i>	54
Bioensaios in vitro com espécies sem ferrão: <i>Melipona scutellaris</i> e <i>Scaptotrigona postica</i>	54
Análises estatísticas	54
Análise das atividades enzimáticas	54
3. Resultados.....	57
4. Discussão.....	66
5. Conclusão	69
6. Referências.....	69
Capítulo 3	78
1. Introdução:.....	78
2. Materiais e Métodos:.....	81
Coleta do material biológico para bioensaios in vitro	81

Obtenção das concentrações/doses realistas de campo para a Flupiradifurona	82
Bioensaios in vitro com <i>Apis mellifera</i>	82
Bioensaios in vitro com espécies sem ferrão: <i>Melipona scutellaris</i> e <i>Scaptotrigona postica</i>	82
Coleta de hemolinfa	82
Contagem total de hemócitos.....	83
Análises estatísticas	83
3. Resultados e discussão	83
4. Conclusão	88
5. Referências.....	88
Considerações finais	94

Introdução geral

A polinização animal aumenta a produção agrícola global em 235-577 bilhões de dólares anualmente (IPBES, 2016) e pode melhorar a qualidade dos frutos (Klatt et al., 2014). Além disso, abelhas e outros insetos que retiram seus alimentos de flores desempenham um papel importante na ecologia, pois são importantes polinizadores, contribuindo assim para a biodiversidade (Biesmeijer et al., 2006; Devillers, 2002). O declínio dos insetos polinizadores (Goulson, Nicholls, Botías, & Rotheray, 2015) é, portanto, uma preocupação não apenas para a agricultura, mas também para a conservação da natureza.

O Brasil abriga inúmeras espécies de abelhas, com os mais diferentes hábitos, tamanhos e graus de organização, sendo que a mais conhecida é a espécie introduzida *Apis mellifera*, considerada generalista, com capacidade de coletar alimento em diversos tipos de flores. Por este motivo, é reconhecida como o polinizador agrícola mais utilizado no mundo, visto que sua distribuição geográfica é global (Gallai et al., 2009; Brittain, C; Potts, 2011). No entanto, esta espécie não é nativa do Brasil, sendo assim, o uso desta espécie em áreas de cultivo aumenta a competição pela busca de alimentos pelas espécies sem ferrão (IBAMA, 2017).

Melipona scutellaris é uma espécie de abelha sem ferrão que tem a capacidade de realizar a polinização por vibração, ato que consiste em vibrar a musculatura torácica para agitar as anteras, o que possibilita a saída do pólen. Esse tipo de polinização é essencial para plantas com anteras poricidas, onde o pólen apenas é liberado por poros apicais (Nunes-Silva & Imperatriz-Fonseca, 2010). Essa espécie está incluída na lista de espécies ameaçadas de extinção. *Scaptotrigona postica* é uma espécie de abelha nativa do Brasil, a qual possui distribuição climática tropical e subtropical, sendo observada na maior parte da América Latina. A referida espécie é um importante polinizador de culturas como café e citros (Nogueira-Neto, 1997).

Quando abelhas são expostas a inseticidas, caso seu efeito não seja letal, podemos observar efeitos subletais, nem sempre perceptíveis, que podem agir tanto no comportamento quanto na fisiologia das abelhas (Spadotto et al., 2004). Por consequência, comprometem a estrutura social e o desenvolvimento da colônia (Nominato, 2012).

O contato das abelhas com os agrotóxicos pode ocorrer tanto *in crop*, quanto *off crop*. O contato *in crop* normalmente ocorre devido a pulverização sobre o indivíduo,

durante o forrageamento, principalmente em plantações com florações; pelo contato com partes das plantas contaminadas, como as folhas e flores; por consumo de pólen e néctar contaminados, que pode ter ocorrido durante a pulverização, ou também pela translocação de produto sistêmico pela planta (Cham et al., 2017). Já o contato *off crop* está bastante associado à deriva das partículas de agrotóxicos aplicadas nas plantações, que podem atingir área próximas aos cultivos agrícolas, onde há o forrageamento desses polinizadores, promovendo sua contaminação tanto pelo contato direto com a poeira advinda da deriva, quanto pelo contato com plantas contaminadas, ou pelo consumo de néctar e pólen contaminados com a poeira da deriva (Cham et al., 2017; Pacífico-da-Silva et al., 2016).

Os agrotóxicos são considerados uma das principais causas do declínio de polinizadores, embora haja outras causas, como, parasitas, pragas, mudanças climáticas e intensificação da agricultura (Goulson et al., 2015). Com o banimento dos principais neonicotinoides no mercado europeu, houve o lançamento de substâncias alternativas. O flupiradifurona – FPF ($C_{12}H_{11}ClF_2N_2O_2$), por exemplo, é um novo agrotóxico lançado que pertence à nova classe química de butenolídeos e é altamente eficaz contra insetos sugadores, principalmente moscas-brancas e pulgões (Nauen et al., 2015). Semelhante aos neonicotinoides, a FPF se liga aos receptores nicotinérgicos de acetilcolina no cérebro do inseto e atua como um agonista reversível (Nauen et al., 2015). A ativação dos receptores de acetilcolina leva à despolarização e, eventualmente, ao bloqueio da transmissão sináptica das sinapses colinérgicas (Casida, 2018).

O FPF é relatado como relativamente seguro para as abelhas europeias, *A. mellifera* (Campbell et al., 2016; Glaberman e White, 2014). Porém, há evidências crescentes de efeitos prejudiciais para polinizadores benéficos, como as abelhas, que são amplamente usadas para polinizar culturas agrícolas tratadas com FPF. Este agrotóxico pode reduzir a sobrevivência e está associado à expressão alterada de genes imunes e de desintoxicação nas abelhas (Al Naggar e Baer, 2019). O FPF também tem vários efeitos comportamentais que podem prejudicar a capacidade de voo das abelhas (Tong et al., 2019) e aumentar comportamentos anormais (Tosi e Nieh, 2019).

Hesselbach & Scheiner (2018) mostraram que a exposição aguda a uma dose alta e não realista de FPF e (1.2 µg/ bee) prejudicou o paladar e a cognição das abelhas. Tan et al. (2015) demonstraram que a exposição crônica ao FPF prejudicou o aprendizado olfativo em larvas (0,033 µg/larvae) e adultas (0,066 µg/bee) de abelhas asiáticas (*Apis cerana*) em doses realistas em campo. Campbell et al. (2016) testaram os efeitos do FPF

em um estudo de campo nos EUA e não observaram efeitos colaterais significativos na colônia de abelhas, porém foram encontrados néctar e pólen contaminados com FPF.

Uma das maneiras para se avaliar a exposição aos agrotóxicos é a utilização de indicadores biológicos, que podem ser definidos como uma alteração (molecular, bioquímica, celular ou fisiológica) numa resposta biológica de um organismo, decorrente da exposição as substâncias tóxicas encontradas no ambiente (RYAN et al., 2007; ISLAS-FLORES et al., 2013). Algumas enzimas tais como acetilcolinesterase (AChE), glutathione-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 análise das atividades das enzimas mencionadas, consistem em parâmetros bioquímicos que, ao serem avaliadas em conjunto, constituem uma importante ferramenta para a detecção de perturbações fisiológicas e para o diagnóstico do efeito de pesticidas em abelhas (Badiou-Bénéteau et al., 2012).

Outro mecanismo de avaliação é a resposta imune, por meio da alteração no número de hemócitos, principais representantes da imunidade celular que se encontram livres na hemolinfa ou aderidos à parede dos órgãos (Lavine; Strand, 2002; Cruz-Landim, 2009). Os hemócitos também estão envolvidos no processo de cicatrização (Krautz; Arefin; Theopold, 2014; Dubovskiy et al., 2016).

Apis mellifera foi adotada como organismo modelo para testes de avaliação de risco no Brasil. No entanto, dentre as principais incertezas apontadas pelo IBAMA (2017), destaca-se sua utilização, uma vez que as abelhas sem ferrão fazem parte da fauna nativa de polinizadores, sendo que uma forma elucidar essa dúvida seria a realização de uma comparação entre *A. mellifera* e espécies sem ferrão, no que se refere à toxicidade e exposição aos agrotóxicos.

As abelhas utilizadas nesse estudo foram escolhidas com base na lista de espécies prioritárias para avaliação de risco de agrotóxicos, publicada pelo IBAMA, que leva em consideração diversos parâmetros, tais como importância como polinizadores, associação com cultivos agrícolas, etc. As espécies *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) e *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) constam na referida lista entre as cinco principais. Entretanto, os indivíduos de *T. spinipes* têm comportamento agressivo e não existe método de criação em caixas de madeira (criação racional). Assim, *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) se mostra como espécie viável de ser estudada, uma vez que apresentam similaridades morfológicas e biológicas com *T. spinipes*.

Diante da contextualização apresentada, o presente estudo visou compreender quais são os impactos que a exposição a doses realistas de campo do FPF, o que esses impactos causam em diferentes fases de abelhas ferrão (*M. scutellaris* e *S. postica*) e *A. mellifera*, e também utilizando de um comparativo entre as espécies para que se possa compreender se a espécie exótica é realmente um organismo que pode ser considerado modelo na avaliação de risco de polinizadores no Brasil.

Referências

- AL NAGGAR, Yahya; BAER, Boris. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- BADIOU-BÉNÉTEAU, Alexandra et al. 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.
- BIESMEIJER, Jacobus C. Et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 351-354, 2006.
- BRITTAIN, Claire; POTTS, Simon 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.
- CAMPBELL, Jacob B. et al. The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. *Journal of insect physiology*, v. 86, p. 11-16, 2016.
- CASIDA, John E. Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects. **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 125-144, 2018.
- Cham, K. D. O., Rebelo, R. M., Oliveira, R. D. P., Ferro, A. A., Viana-Silva, F. D. C., Borges, L. D. O., ... & Macedo, T. C. (2017). Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. *Brasília: Ibama/Diqua*, 105.
- 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*, USA, v. 5, n. 15, p.615-636, 2006
- DA CRUZ LANDIM, Carmina. Abelhas. Unesp, 2009.
- DEVILLERS, James; PHAM-DELÈGUE, Minh-Hà (Ed.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. CRC Press, 2002.
- DUBOVSKIY, I. M. et al. Encapsulation and nodulation in insects. **Invertebrate Survival Journal**, v. 13, n. 1, p. 229-246, 2016.
- ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 3-8, 2005.
- GALLAI, Nicola et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological economics**, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.

GLABERMAN, S.; WHITE, K. Environmental fate and ecological risk assessment for foliar, soil drench, and seed treatment uses of the new insecticide flupyradifurone (byi 02960). US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division EFED, Environmental Risk Branch IV, v. 187, 2014.

Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C. & Rotheray, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* (80-347), 1255957–1255957 (2015).

HESSELBACH, Hannah; SCHEINER, Ricarda. Effects of the novel pesticide flupyradifurone (Sivanto) on honeybee taste and cognition. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; NUNES-SILVA, Patrícia. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. *Biota Neotropica*, v. 10, p. 59-62, 2010.

ISLAS-FLORES, Hariz et al. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 92, p. 32-38, 2013.

IPBES. 2016. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. Potts SG et al., eds. Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany.

KLATT, Björn K. et al. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1775, p. 20132440, 2014.

KRAUTZ, Robert; AREFIN, Badrul; THEOPOLD, Ulrich. Damage signals in the insect immune response. **Frontiers in plant science**, p. 342, 2014.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

NAUEN, Ralf et al. Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. *Pest management science*, v. 71, n. 6, p. 850-862, 2015.

NIEH, James C.; TOSI, Simone. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, v. 237, p. 124408, 2019.

NOGUEIRA-NETO, Paulo. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. 1997.

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

OAKESHOTT, John G. Et al. Comparing the organophosphorus and carbamate insecticide resistance mutations in cholin-and carboxyl-esterases. **Chemico-Biological**

PACÍFICO-DA-SILVA, Idalécio; MELO, Marília Martins; BLANCO, Benito Soto. Efeitos tóxicos dos praguicidas para abelhas. **Revista brasileira de higiene e sanidade animal**, v. 10, n. 1, p. 142-157, 2016

RYAN, P. B.; BURKE, T. A.; HUBAL, E. A. C.; CURA, J. J.; MCKONE, T. E. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, v. 155, n. 5, p. 833-840, 2007.

SPADOTTO, Claudio A. et al. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. 2004.

TAN, Ken et al. A neonicotinoid impairs olfactory learning in Asian honey bees (*Apis cerana*) exposed as larvae or as adults. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2015.

TONG, Linda; NIEH, James C.; TOSI, Simone. Combined nutritional stress and a new systemic pesticide (flupyradifurone, Sivanto®) reduce bee survival, food consumption, flight success, and thermoregulation. **Chemosphere**, v. 237, p. 124408, 2019.

Considerações finais

Com base nos resultados obtidos por meio do presente estudo, pode-se concluir que:

- Os resultados fornecem dados essenciais para caracterizar os riscos da exposição das abelhas sem ferrão ao inseticida flupiradifurona;
- Concentrações/Doses realistas de campo de flupiradifurona podem afetar o desenvolvimento das espécies estudadas;
- Os efeitos da exposição ao agrotóxico FPF, como redução da sobrevivência e atrasos no desenvolvimento, podem contribuir para o declínio da colônia ao longo do tempo.
- Os biomarcadores de enzimas metabólicas, antioxidantes e de desintoxicação aqui utilizados, demonstraram sua eficácia na identificação de efeitos subletais, apontando diferentes respostas da exposição para as espécies de abelhas analisadas.
- Os estudos apresentados nesta tese demonstraram que há diferentes respostas imunológicas entre as espécies de abelhas estudadas, inferindo uma sensibilidade distinta entre elas, reforçando que os dados obtidos para *A. mellifera* não podem ser extrapolados para outras espécies de abelhas;
- Mesmo sendo considerado um agrotóxico seguro para abelhas, o flupiradifurona demonstrou que necessita de atenção dos órgãos regulatórios;
- Enfatizamos que espécies sem ferrão possam ser utilizadas como modelo experimental para avaliação de risco, contribuindo para a geração de informações adequadas para subsidiar estratégias de conservação dessas espécies.