

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE**

**ANA PAULA SALOMÉ LOURENCETTI**

**“SENSIBILIDADE DE ABELHAS BRASILEIRAS A AGROTÓXICOS:  
AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL BASEADA NO MODELO *Apis mellifera*  
LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE)”**

**ARARAS**

**2022**

**ANA PAULA SALOMÉ LOURENCETTI**

**“SENSIBILIDADE DE ABELHAS BRASILEIRAS A AGROTÓXICOS:  
AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL BASEADA NO MODELO *Apis mellifera*  
LINNAEUS, 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE)”**

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Agricultura e Ambiente ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

**ARARAS**

**2022**

Salomé Lourencetti, Ana Paula

Sensibilidade de abelhas brasileiras a agrotóxicos:  
Avaliação de Risco Ambiental baseada no modelo *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) / Ana Paula Salomé Lourencetti -- 2022.  
52f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras  
Orientador (a): Roberta Cornélio Ferreira Nocelli  
Banca Examinadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, Cristiano Menezes, José Bruno Malaquias  
Bibliografia

1. Ecotoxicologia . 2. Abelhas nativas . 3. Agrotóxicos. I. Salomé Lourencetti, Ana Paula. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8  
7083



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Ana Paula Salomé Lourencetti, realizada em 28/10/2022.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (UFSCar)

Prof. Dr. Cristiano Menezes (CNPMA)

Prof. Dr. José Bruno Malaquias (UFPB)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas queridas e amigos de tantos anos que me acompanham nessa jornada e que de alguma forma me incentivaram a seguir em frente em um momento tão delicado como o que passamos nesses últimos anos. Aos companheiros de morada, Fernanda, Diego e Cinthia, obrigada pelo cuidado.

Aos colegas do grupo de pesquisa Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAs), em especial Guilherme e Cliver, sempre dispostos em ajudar nos experimentos. Também agradeço a Patrícia, pelas muitas conversas e conselhos em relação a escrita e ao desenvolvimento do presente trabalho, e ao Lucas pela ajuda com a análise e interpretação dos dados.

Ao programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, pela experiência acadêmica e possibilidade de realização desse trabalho.

Também agradeço aos órgãos de fomento à pesquisa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa cedida (código de financiamento 001), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2017/21097-3), pelos projetos aprovados e financiados para produção de conhecimento relacionado as abelhas sem ferrão.

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores que mesmo em um cenário de cortes e desvalorização da profissão, continuam produzindo conhecimento de qualidade e contribuem para o desenvolvimento social, bem-estar humano e preservação ambiental.

## RESUMO GERAL

Os ensaios toxicológicos utilizados como padrão para avaliação de risco ambiental de agrotóxicos em abelhas adotados pelo Brasil e por outros países do mundo são estabelecidos pelos protocolos desenvolvidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, onde é recomendado o uso de ingredientes ativos na espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae). Em um contexto em que são apontadas lacunas quanto a representatividade desses protocolos em relação ao modelo biológico utilizado e a misturas entre diferentes classes de agrotóxicos, estudos ecotoxicológicos envolvendo abelhas nativas sem ferrão são passos importantes para o desenvolvimento de um processo regulatório mais protetivo no Brasil. O presente trabalho, avaliou a toxicidade de um produto comercial da classe dos neonicotinoides de maneira isolada e combinada a um herbicida e um fungicida em três espécies de abelhas sem ferrão consideradas modelos biológicos para a avaliação de risco ambiental em polinizadores no Brasil: *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae), *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae). Utilizando testes de toxicidade oral adaptados e comparando a sensibilidade dessas abelhas com o atual modelo biológico constatamos que os protocolos existentes não são protetivos devido a maior sensibilidade encontrada nos representantes desse grupo de abelhas e a interações toxicológicas quando o inseticida foi ofertado em combinações binárias. É necessário, portanto, incorporar esses polinizadores no processo de avaliação de risco ambiental brasileiro e criar regulamentações em relação ao uso de misturas antes ou após a aplicação.

**Palavras – chave:** Concentração Letal Mediana, Dose Letal Mediana, polinizadores, sensibilidade, modelo biológico.

## ABSTRACT

Ecotoxicological tests realized to assess the environmental risks of pesticides to bees used by countries around the world are based on the protocols developed by the Organization for Economic and Cooperation, where is recommended the use of isolated active ingredients in surrogate species *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae). Once the representativeness of these protocols concerning the surrogate and pesticide mixtures is pointed out as gaps regarding the pesticide risk assessment, the development of ecotoxicological studies about stingless bees is a crucial step toward achieving a more protective regulatory process in Brazil. The present work evaluated the toxicity of a neonicotinoid commercial product, isolated and combined with an herbicide and a fungicide in three species of stingless bees considered possible surrogates for the assessment of environmental risk in pollinators in Brazil *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae), *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) and *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae). Through adapted oral toxicity tests and comparison of the sensitivity of these bees with the current biological model, we highlight that existing protocols do not protect stingless bee biodiversity due to the greater sensitivity found in representatives and due to toxicological interactions when the insecticide was offered in binary combinations. Therefore, it is a major necessity to incorporate these pollinators into the Brazilian environmental risk assessment process and create regulations regarding the use of mixtures before or after pesticide application.

**Keywords:** Median Lethal Concentration, Median Lethal Dose, pollinators, sensitivity, biological model.



## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.INTRODUÇÃO GERAL.....</b>                         | <b>1</b>  |
| <b>2.OBJETIVOS.....</b>                                | <b>4</b>  |
| 2.1.Objetivo geral.....                                | 4         |
| 2.2.Objetivos específicos.....                         | 4         |
| <b>3.HIPÓTESES E ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>              | <b>5</b>  |
| CAPÍTULO I – Artigo 1.....                             | 10        |
| <b>1.INTRODUÇÃO.....</b>                               | <b>12</b> |
| <b>2.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                       | <b>14</b> |
| 2.1.Delineamento experimental.....                     | 14        |
| 2.1.1.Material biológico.....                          | 14        |
| 2.1.2.Bioensaios de toxicidade.....                    | 15        |
| 2.2.Determinação da $Cl_{50}$ e da $DL_{50}$ oral..... | 15        |
| <b>3.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>                      | <b>15</b> |
| <b>4.RESULTADOS.....</b>                               | <b>16</b> |
| <b>5.DISSCUSSÃO.....</b>                               | <b>19</b> |
| <b>6.CONCLUSÃO.....</b>                                | <b>22</b> |
| <b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>               | <b>23</b> |
| CAPÍTULO II – Artigo 2.....                            | 29        |
| <b>1.INTRODUÇÃO.....</b>                               | <b>31</b> |
| <b>2.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                       | <b>33</b> |
| 2.1.Delineamento experimental.....                     | 33        |
| 2.1.1.Material biológico.....                          | 34        |
| 2.1.2.Bioensaios de toxicidade.....                    | 34        |
| 2.2.Teste limite.....                                  | 35        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3.Determinação CL <sub>50</sub> e da DL <sub>50</sub> do tiametoxam em combinações binárias..... | 35        |
| <b>3.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>4.RESULTADOS.....</b>   | <b>36</b> |
| 4.1.Teste limite.....  | 36        |
| 4.2.Bioensaios de toxicidade do tiametoxam em combinações binárias.....                            | 37        |
| <b>5.DISSCUSSÃO.....</b>   | <b>39</b> |
| <b>6.CONCLUSÃO.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>5.CONCLUSÃO GERAL.....</b>  | <b>51</b> |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Vivemos em um mundo marcado pela antropização de ambientes naturais, o que nos leva ao cenário atual de mudanças climáticas, esgotamento de recursos naturais, surgimento de novas doenças e perda da biodiversidade animal e vegetal (VALIENTE–BANUET et al., 2015; IPBES, 2019; GIBBARD et al., 2022). Ao se tratar da última, o atual declínio de insetos cria um alerta para a sociedade em relação a políticas de proteção e conservação, devido ao papel chave na manutenção dos ecossistemas e no provimento de serviços ecossistêmicos que contribuem direta ou indiretamente para o bem-estar da humanidade (SÁNCHEZ–BAYO; WYCKHUYS, 2019; WAGNER et al., 2021).

O processo de intensificação e industrialização da agricultura dado a partir de meados do século 20, caracterizado pela prática da monocultura em grandes extensões de terra e uso intensivo de maquinários e insumos agrícolas – como fertilizantes e agrotóxicos – está diretamente relacionado a perda global da quantidade de espécies e biomassa de insetos (RAVEN; WAGNER, 2020; NATH; SINGH; MUKHERJEE, 2022; OUTHWAITE; MACCANN; NEWBOLD, 2022). Tal processo se destaca atualmente em regiões tropicais e subtropicais, como acontece com o Brasil, país que possui a maior biodiversidade de insetos do mundo e que nos últimos anos apresenta índices crescentes de desmatamento e expansão de áreas destinadas à pastagem e plantio de monoculturas (KUSCHNIG et al., 2021; ABREU et al., 2022; NATH; SINGH; MUKHERJEE, 2022; SCHWARZMUELLER; KASTNER, 2022).

O serviço ecossistêmico de polinização, realizado principalmente por abelhas (Hymenoptera) que ao irem de flor em flor em busca de recursos para sua sobrevivência possibilitam a reprodução cruzada e conseqüente produção de frutos de grande parte das angiospermas, o que inclui cerca de 85% das espécies vegetais cultivadas pelo homem, é extremamente impactado por esse modo de produção. Em especial pelo uso indiscriminado de agrotóxicos, apontado como principal causas de mortalidade de abelhas no país (PIRES et al., 2016; CASTILHOS et al., 2019; BRUHL; ZALLER, 2019; NATH; SINGH; MUKHERJEE, 2022).

O estudo realizado por Pignati et al. (2017) levantou dados sobre o plantio de 21 culturas relacionando-as com o uso de agrotóxicos, sendo no ano de 2015 plantados 71,2 milhões de hectares e 889 milhões de litros de agrotóxicos. Tais dados inferem que, ao visitarem a maioria de nossas culturas agrícolas para obtenção de recursos, abelhas

nativas e exóticas estão expostas a uma série de agrotóxicos que podem causar efeitos letais e subletais, seja por meio do contato com partículas que ficam no ar e na superfície de flores e folhas ou pela ingestão de pólen e néctar contaminado (SERRÃO et al., 2022; TOSI et al., 2022).

O registro de novos agrotóxicos requer o processo de avaliação em relação aos impactos na saúde humana e no meio ambiente, sendo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) responsáveis pela aprovação dos mesmos no mercado (CALVACANTE, 2022; DAUFENBACK et al., 2022).

Do ponto de vista ambiental a avaliação dos ingredientes ativos de agrotóxicos ocorre em duas vertentes: a Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) e a Avaliação de Risco Ambiental (ARA). A Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental se baseia na toxicidade inerente do agrotóxico e em testes laboratoriais. Enquanto a Avaliação de Risco Ambiental considera a exposição do organismo não-alvo, levando em conta a época de aplicação, modo, dose, cultura agrícola, clima e outros fatores que podem intensificar ou não o risco na realização de testes de laboratório, semi-campo, e campo, de maneira faseada e interdependente (CHAM et al., 2017).

O primeiro protocolo de Avaliação de Risco Ambiental no país (2017) foi pioneiro na América Latina e foi estabelecido pelo órgão ambiental tendo como foco os polinizadores devido a relevância e o contato direto com agrotóxicos nas lavouras brasileira. Apesar da sua implementação no país ser um avanço, o presente protocolo – assim como em outros lugares do mundo – usa como organismo modelo a abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) representando as demais espécies de polinizadores, e utilizam ingredientes ativos isolados, sem avaliar condições de campo onde há a presença de adjuvantes e misturas entre diferentes classes de agrotóxicos, pontos que podem agravar o efeito dos agrotóxicos nesses organismos não alvo (CHAM et al., 2017; SALES et al., 2022).

Abelhas da tribo Meliponini, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, são um diverso grupo de abelhas verdadeiramente eussociais que ocupam todos os biomas brasileiros e que se destacam na polinização agrícola (GIANNINI et al., 2020; LIMA; MARCHIORO, 2021). Sete gêneros de abelhas sem ferrão, Melipona, Trigona,

Tetragonisca, Partamona, Scaptotrigona, Paratrigona e Friesiomellita estão entre os 16 mais importantes para polinização dos cultivos que dependem ou são beneficiados pela visita de abelhas (GIANNINI et al., 2020).

Por estarem em abundância nessas paisagens são expostas simultaneamente a diferentes classes de agrotóxicos (TOLEDO–HERNÁNDEZ et al., 2022). Estudos demonstram que essas abelhas possuem maior e diferentes sensibilidades aos agrotóxicos quando há a comparação de dados em relação à espécie modelo *A. mellifera* (ARENA; SGOLASTRA, 2014; QUIROGA–MURCIA et al. 2017; JACOB et al. 2019; PADILHA et al., 2020; MIOTELO et al., 2021, SALES et al., 2022). A espécie *Mellipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae) apresentou Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>) vinte vezes mais alta para o inseticida abamectina em comparação com *A. mellifera* (BRIGANTE et al., 2021), espécies como *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera, Apidae), *Tetragonisca fiebrige* Schwarz, 1938 (Hymenoptera, Apidae), e *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae), também demonstram maior sensibilidade a inseticidas (JACOB et al., 2019; ALMEIDA et al., 2021; PIOVESAN et al., 2021).

Em relação a misturas e ao uso produtos formulados, são recentes os trabalhos que avaliam os efeitos dos mesmos em abelhas sem ferrão (DA COSTA DOMINGUES, 2017; TOMÉ et al., 2017; BRIGANTE et al., 2021). Misturas entre agrotóxicos de diferentes classes e mecanismos de ação podem resultar em uma toxicidade maior ou menor do que efeitos aditivos ou não aditivos esperados para seus componentes (RIZATTI et al., 2016; HERNÁNDEZ; GIL; LACASANA, 2017; AZPIAZU et al., 2021), como acontece com abelhas em bioensaios realizados com misturas binárias e ternárias contendo inseticidas neonicotinoides (SGOLASTRA et al., 2018; ROBINSON et al., 2017, TOMÉ et al., 2017; DA COSTA DOMINGUES et al., 2017; ALMASRI et al., 2020; ALMASRI et al., 2021).

Apesar do estabelecimento do processo de avaliação de risco ambiental em polinizadores e de ações de diferentes setores para o desenvolvimento de estudos no país, o processo regulatório ainda deixa de representar condições de campo onde essas espécies nativas estão expostas a uma variedade de produtos comerciais, que de modo isolado ou em misturas, podem estar oferecendo um risco que não é avaliado quando os testes de toxicidade utilizam ingredientes ativos de maneira isolada em apenas uma espécie modelo (PANIZZI, SUCIU ; TREVISAN, 2016; TADEI et al., 2019; SGOLASTRA et al., 2020; TOSI et al., 2022).

Há, portanto, a necessidade em realizar trabalhos que colaborem para o preenchimento das lacunas de conhecimento e inclusão dessas abelhas no processo regulatório brasileiro (BIRELEY et al., 2018; CHAM et al., 2019; DORIGO et al., 2018). Dentro do contexto aqui levantado, o trabalho apresentado avaliou essas lacunas partindo da determinação da Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) e da Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>) oral, isolada e em combinações binárias de três formulações comerciais em diferentes espécies de abelhas nativas sem ferrão, comparando a sensibilidade dessas em relação a *A. mellifera* por meio da construção de uma curva de sensibilidade. Para tal, foram testados o inseticida neonicotinóide tiametoxam (Actara® 250 WG), o herbicida enzimático glifosato (Roundup Original® Mais), e o fungicida triazol tebuconazol (Tebufort®), em três espécies consideradas possíveis modelos para avaliação de risco ambiental que possuem diferentes tamanhos – fator que influencia diretamente na sensibilidade aos agrotóxicos – ampla distribuição geográfica, colônias populosas e frequente exposição aos agrotóxicos por realizarem a polinização de diferentes culturas agrícolas (DORIGO et al., 2018; VIANA - SILVA et al., 2018; CHAM et al., 2019). São elas: *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae), conhecida como jataí, *S. postica*, conhecida como mandaguari, e *M. scutellaris*, conhecida como uruçú nordestina.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho é analisar se os protocolos de avaliação de risco de agrotóxicos definidos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e adotados pelo Brasil são protetivos para espécies de abelhas sem ferrão brasileiras.

### **2.2. Objetivos específicos**

- 1). Obter a DL<sub>50</sub> oral do inseticida tiametoxam (Actara® 250 WG) em espécies de abelhas sem ferrão escolhidas como potenciais modelos no processo de Avaliação de Risco Ambiental brasileiro;
- 2). Identificar relações entre tamanho corporal e sensibilidade entre as espécies;
- 3). Estabelecer a variação da sensibilidade entre espécies de abelhas sem ferrão em relação à espécie padrão utilizada *A. mellifera* com base em dados disponíveis na literatura;

- 4). Obter a DL<sub>50</sub> oral das combinações binárias do agrotóxico tiametoxam (Actara® 250 WG) com o fungicida tebuconazol (Tebufort®) e o herbicida glifosato (Roundup Original® Mais) em espécies de abelhas sem ferrão escolhidas como potenciais modelos no processo de Avaliação de Risco Ambiental;
- 5). Estabelecer a variação da DL<sub>50</sub> entre as exposições isolada e combinada e avaliar possíveis interações toxicológicas, como sinergismo e antagonismo.

### 3. HIPÓTESES E ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS

O primeiro capítulo da presente dissertação buscou definir a toxicidade isolada do inseticida neonicotinóide tiametoxam. Além disso, fez-se a comparação das sensibilidades entre as três espécies de abelhas sem ferrão e a espécie *A. mellifera*, atual modelo utilizado no processo de avaliação de risco ambiental para polinizadores no Brasil. Partiu-se da hipótese de que o uso do atual modelo biológico em testes ecotoxicológicos presentes no processo de avaliação de risco à agrotóxicos não é protetivo para as abelhas sem ferrão, e que a diferença encontrada em relação a diversidade de tamanhos corporais influencia diretamente na toxicidade oral.

Já o segundo capítulo avalia interações entre a combinação de um fungicida e de um herbicida em relação a toxicidade do tiametoxam a partir de misturas binárias. Partiu-se da hipótese de que agrotóxicos considerados seguros em termos de toxicidade para abelhas podem interagir com inseticidas altamente tóxicos, agravando os efeitos no organismo das abelhas.

Ambos os capítulos estão em formato de artigo e trazem implicações científicas para o desenvolvimento de testes de toxicidade que visam uma maior protetividade a esses polinizadores no processo regulatório.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. C. et al. Temporal and spatial patterns of fire activity in three biomes of Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 844, p. 157138, 2022.

ALMASRI, H. et al. Mild chronic exposure to pesticides alters physiological markers of honey bee health without perturbing the core gut microbiota. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2022.

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. 111013, 2020.

ALMEIDA, C. H. S. et al. Sublethal agrochemical exposures can alter honey bees' and Neotropical stingless bees' color preferences, respiration rates, and locomotory responses. **Science of the Total Environment**, v. 779, p. 146432, 2021.

ARENA, M.; SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 324 –334, 2014.

BIRELEY, R. et al. Preface: Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 1-3, 2019.

BRIGANTE, J. et al. Acute toxicity of the insecticide abamectin and the fungicide difenoconazole (individually and in mixture) to the tropical stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 9, p. 1872-1879, 2021.

BRÜHL, C. A.; ZALLER, J. G. Biodiversity decline as a consequence of an inappropriate environmental risk assessment of pesticides. **Frontiers in Environmental Science**, p. 177, 2019.

CASTILHOS, D. et al. Bee colony losses in Brazil: a 5 –year online survey. **Apidologie**, v. 50, n. 3, p. 263-272, 2019.

CAVALCANTE, I. L. P. C. AGROTÓXICOS: contexto, aplicabilidade e toxicidade dos ingredientes ativos mais utilizados no Brasil. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**.

CHAM, K. O. et al. **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. Brasília. Ibama/Diqua, 2017. 105.

CHAM, O. et al. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 36-48, 2019.

DA COSTA DOMINGUES, C. E. C. et al. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v.186, p.994-1005, 2017.

DAUFENBACK, V. et al. Agrotóxicos, desfechos em saúde e agroecologia no Brasil: uma revisão de escopo. **Saúde em Debate**, v. 46, p. 482-500, 2022.

DORIGO, A. et al. Biological data of stingless bees with potential application in pesticide risk assessments. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 777-779, 2018.



GIANNINI, T. C. et al. Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. **Apidologie**, v. 51, n. 3, p. 406-421, 2020.

GIBBARD, P. et al. The Anthropocene as an Event, not an Epoch. **Journal of Quaternary Science**, v. 37, n. 3, p. 395-399, 2022.

HERNÁNDEZ, A. F.; GIL, F.; LACASANA M. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. **Arch Toxicol**, v.91, p.3211-3223, 2017.

IPBES (2019): **Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**. E. S. Brondizio, J. Settele, S. Díaz, and H. T. Ngo (editors). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 1148 pages.

JACOB, C. R. O. et al. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 28, n. 7, p. 744 -753, 2019.

KUSCHNIG, N. et al. Spatial spillover effects from agriculture drive deforestation in Mato Grosso, Brazil. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

LIMA, V. P.; MARCHIORO, C. A. Brazilian stingless bees are threatened by habitat conversion and climate change. **Regional Environmental Change**, v. 21, n. 1, p. 1-12, 2021.

MIOTELO, Lucas et al. *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115770, 2021.

NATH, R.; SINGH, H.; MUKHERJEE, S Insect pollinators decline: an emerging concern of Anthropocene epoch. **Journal of Apicultural Research**, p. 1-16, 2022.

OUTHWAITE, C. L.; MCCANN, P.; NEWBOLD, T. Agriculture and climate change are reshaping insect biodiversity worldwide. **Nature**, v. 605, n. 7908, p. 97-102, 2022.

PADILHA, A. C. et al. Toxicity of insecticides on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Fries) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz)(Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Ecotoxicology**, v. 29, n. 1, p. 119-128, 2020.

PANIZZI, S.; SUCIU, N. A.; TREVISAN, M. Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 136-146, 2017.

PIGNATI, W. A. et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

PIOVESAN, B. et al. Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 34, p. 42472-42480, 2020.

PIRES, C. S. et al. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: are there cases of CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 422-442, 2016.

PIRES, C.S.S. & TOREZANI, K.R.S (2018). **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos**, Brasília: IBAMA. 84 p.

QUIROGA –MURCIA, D. E. et al. Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). **Agronomía Colombiana**, v. 35, n. 3, p. 340-349, 2017.

RAVEN, P. H.; WAGNER, D. L. Agricultural intensification and climate change are rapidly decreasing insect biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 2, p. e2002548117, 2021.

ROBINSON, A. et al. Comparing bee species responses to chemical mixtures: Common response patterns? **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0176289, 2017.

SALES, V. R. et al. A systematic review of research conducted by pioneer groups in ecotoxicological studies with bees in Brazil: advances and perspectives. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-22, 2022.

SÁNCHEZ –BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological conservation**, v. 232, p. 8-27, 2019.

SCHWARZMUELLER, F.; KASTNER, T. Agricultural trade and its impacts on cropland use and the global loss of species habitat. **Sustainability Science**, p. 1-15, 2022.

SERRÃO, J. E. et al. Side –effects of pesticides on non –target insects in agriculture: a mini –review. **The Science of Nature**, v. 109, n. 2, p. 1-11, 2022.

SGOLASTRA, F. et al. Combined exposure to sublethal concentrations of an insecticide and a fungicide affect feeding, ovary development and longevity in a solitary bee. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 285, n. 1885, p. 20180887, 2018.

TADEI, R. et al. Late effect of larval co –exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Sci. Rep.**, v.9, 2019.

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

- TOLEDO-HERNÁNDEZ, E. et al. The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. **Apidologie**, v. 53, n. 1, p. 1-23, 2022.
- TOMÉ, H.V. et al. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **R. Soc. Open Sci.** v.4, n.1, 2017.
- TOSI, S. et al. Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta-analysis and new risk assessment tools. **Science of The Total Environment**, p. 156857, 2022.
- VALIENTE-BANUET, Al. et al. Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. **Functional Ecology**, v. 29, n. 3, p. 299-307, 2015.
- VIANA-SILVA, F. et al. 1.12 Selection matrix for Brazilian bee species to risk assessment of pesticides. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 462, p. 56-61, 2018.
- WAGNER, D. L. et al. Insect decline in the Anthropocene: Death by a thousand cuts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 2, p. e2023989118, 2021.

## CAPÍTULO 1

### Abelhas sem ferrão e a Avaliação de Risco Ambiental: dados toxicológicos de três espécies de abelhas sem ferrão.

Ana Paula Salomé Lourencetti<sup>a</sup>, Patricia Azevedo<sup>b</sup>, Roberta Cornélio Ferreira Nocelli<sup>c</sup>

#### RESUMO

O Brasil é o maior detentor espécies de abelhas sem ferrão do mundo e é necessária a introdução de espécies representativas desse grupo de abelhas nas avaliações de risco de agrotóxicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi encontrar a Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) do inseticida tiametoxam de três espécies de abelhas sem ferrão, levando em consideração ou não o peso das espécies ao estimar a Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>). Os testes ecotoxicológicos foram realizados seguindo as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico e analisados de acordo com o modelo linear logit, curvas de distribuição de sensibilidade entre as espécies e cálculo das razões de sensibilidade. Os resultados mostraram que as abelhas sem ferrão testadas são mais sensíveis ao tiametoxam do que *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae), utilizada como organismo modelo nos testes. Para a CL<sub>50</sub> obtivemos esta sequência, da espécie mais suscetível a espécie mais tolerante, *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae) > *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae) > *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) > *A. mellifera*, seguida dos valores de DL<sub>50</sub> considerando o peso das abelhas, *M. scutellaris* > *S. postica* > *T. angustula* > *A. mellifera*, ou não *T. angustula* > *M. scutellaris* > *S. postica* > *A. mellifera*. As diferentes sensibilidades entre as espécies de abelhas sem ferrão destacam a importância de inserir mais de uma espécie modelo com uma variedade de tamanhos no desenvolvimento de pesquisas e protocolos. Além disso, nossos resultados mostram a necessidade de investigar padrões sobre a influência da massa corporal na sensibilidade aos agrotóxicos por diferentes espécies.

**Palavras-chave:** Metabolismo, neonicotinoides, abelhas nativas

## ABSTRACT

Brazil is the largest holder of stingless bees in the world and the introduction of bees that are more representative species in pesticide risk assessments is necessary. Therefore, the objective of this work was to determine the Median Lethal Concentration (LC<sub>50</sub>) of three species of stingless bees, taking or not their weight into account to estimate Median Lethal Dose (LD<sub>50</sub>), using the insecticide thiamethoxam. The ecotoxicological tests were conducted following the Organization for Economic Co-operation and Development guidelines and analyzed according to the linear logit model, species-sensitive distribution curves and sensitivity ratios. The results showed that the stingless bees tested are more sensitive to thiametoxam than the *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) used as a model organism in the tests. LC<sub>50</sub>, we have this sequence of the most susceptible and most tolerant species *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae) > *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae) > *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) > *A. mellifera*, followed by LD<sub>50</sub> values considering the weight of the bees *M. scutellaris* > *S. postica* > *T. angustula* > *A. mellifera* or not *T. angustula* > *M. scutellaris* > *S. postica* > *A. mellifera*. The different sensitivities among stingless bee species highlight the importance of inserting more than one surrogate species with a variety of sizes in research and protocol development. In addition, our results show the need to investigate patterns regarding the influence of body mass on pesticide sensitivity among stingless bee species.

**Keywords:** Metabolism, neonicotinoids, native bees

## 1. INTRODUÇÃO

A monocultura como prática agrícola demanda grandes áreas, causando degradação de habitats naturais, perda de recursos florais e alta demanda por agrotóxicos (SÁNCHEZ-BAYO; WYCKHUYS, 2019; OLIVEIRA, 2021; KRÖGER, 2022). Essa prática impacta diretamente a biodiversidade de espécies de abelhas e de outros polinizadores, ameaçando o acesso da sociedade a alimentos e fontes de renda, além de comprometer a existência de espécies animais e vegetais (IPBES, 2019; GEMMI-HERREN et al., 2021). A manutenção da biodiversidade de abelhas atende diretamente aos objetivos de desenvolvimento sustentável definidos para o ano de 2030 pela ONU (Organização das Nações Unidas), que estabelece como prioridade a proteção dos recursos naturais e do clima para as gerações futuras (WOOD et al., 2018; DANGLES; CASAS, 2019; KEMMERLING et al., 2020; PATEL et al., 2021).

A produção e acesso ao conhecimento científico possui papel fundamental na conservação desses polinizadores, uma vez que o entendimento de como fatores relacionados a diferentes modos de produção agrícola interagem com a biodiversidade abelhas são essenciais para ocorram o engajamento e o debate entre diferentes setores da sociedade, além da criação de políticas públicas e legislações mais protetivas (DECOURTYE et al., 2019; STRUELENS; SILVIE, 2020; DEMORTAIN, 2021; HIPÓLITO et al., 2021), como é o caso do conhecimento produzido em relação aos efeitos dos inseticidas neonicotinoides em abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) que foi essencial para a mobilização que levou ao banimento parcial desses agrotóxicos e melhorias em relação ao processo regulatório em países da União Europeia e Estados Unidos (GOULSON, 2020).

Atualmente, os bioensaios toxicológicos que integram a Avaliação de Risco Ambiental de agrotóxicos para polinizadores ao redor do mundo seguem as diretrizes estabelecidas pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (OCDE 213, 1998a, OCDE 214, 1998b, OCDE 245, 2017; OCDE 239, 2016). Sendo proposto o uso da abelha exótica *A. mellifera* como modelo biológico devido à sua importância como polinizadora de culturas agrícolas, ampla distribuição geográfica, colônias populosas, biologia bem conhecida e boa adaptação às condições experimentais (BIRELEY et al., 2018; DECOURTYE et al., 2019; DIETZCH; JÜTTE, 2020; LOPEZ-URIBE, 2021; SCHMOLKE et al., 2021). A espécie também é utilizada na maioria dos estudos que

apresentam o impacto desses estressores ambientais em polinizadores (GRADISH, 2019; THOMPSON; PAMMINGER, 2019).

No entanto, a sensibilidade das abelhas aos agrotóxicos varia de acordo com fatores como tamanho corporal, ciclos de vida, metabolismo, comportamento, fisiologia e rotas de exposição aos agrotóxicos (WILLIAMS, 2010; UHL et al., 2016; BOYLE et al., 2018; TAI et al., 2022). Sendo a extrapolação de dados de toxicidade obtidos para a espécie modelo em relação a outras abelhas de comportamento social e solitário questionada por pesquisadores ao redor de mundo (ARENA ; SGOLASTRA 2014; PAMMINGER, 2020; SIVITER; RICHMAN; MUTH, 2021; DE ASSIS et al., 2022).

Atualmente é consenso que dados relacionados à toxicidade de agrotóxicos de grupos distintos de abelhas precisam ser obtidos e avaliados quanto a inserção nos protocolos de Avaliação de Risco Ambiental (SALES et al., 2022, TOSI et al., 2022). Em 2017, o Workshop denominado “Pesticide Exposure Paradigm for non-Apis bees Workshop” discutiu diferentes lacunas presentes na literatura científica, identificando obstáculos para incluir espécies de abelhas não Apis nas avaliações de risco ambiental (GRADISH et al., 2019). As abelhas sem ferrão – grupo de abelhas com origem e distribuição neotropical e que são altamente afetadas pela exposição a agrotóxicos – se destacaram devido à grande variedade espécies descritas e a falta de dados sobre as mesmas (BOYLE, 2019; CHAM et al., 2019; LÓPEZ - URIBE, 2021).

O Brasil tem o maior número de espécies de abelhas sem ferrão do mundo, sendo abundantes em culturas agrícolas e expostas a agrotóxicos (LIMA et al., 2016; TOLEDO-HERNANDÉZ et al., 2022). Por isso, é fundamental o desenvolvimento de estudos ecotoxicológicos para avaliar os riscos desses polinizadores, uma vez que apresentam maior suscetibilidade aos agrotóxicos do que *A. mellifera* (ARENA; SGOLASTRA, 2014; SALES et al., 2022).

Nos últimos anos, pesquisas no país têm sido coordenadas pelo Instituto Brasileiro de Recursos Renováveis (IBAMA) em conjunto com laboratórios de Universidades e empresas privadas, sendo padronizados e testados protocolos para realização de bioensaios de toxicidade oral e tópica de agrotóxicos em abelhas sem ferrão, bem como a definição de espécies listadas como possíveis modelos biológicos (VIANA-SILVA et al., 2018; DORIGO et al., 2018; CHAM et al., 2019; ROSA - FONTANA et al., 2020). Esse tipo de pesquisa é essencial para proteger esses polinizadores em paisagens

agrícolas, colaborando para melhoras no processo regulatório, uma vez que podem responder se o atual processo é protetivo ou não para biodiversidade de abelhas sem ferrão encontradas no país (BIRELEY et al., 2019; CHAM et al., 2019; THOMPSON; PAMMINGER, 2019; SALES et al., 2022).

Assim, o presente estudo determinou a Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) e estimou a Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>) do inseticida neonicotinóide tiametoxam em sua formulação comercial em três espécies de abelhas sem ferrão: *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae), *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae). Com esses dados de toxicidade realizamos curvas de distribuição de sensibilidade entre espécies (SSD) e calculamos a razão de sensibilidade entre *A. mellifera* e as abelhas sem ferrão utilizadas nos bioensaios, com o objetivo de corroborar com informações sobre a sensibilidade de abelhas sem ferrão a agrotóxicos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Delineamento experimental**

#### **2.1.1. Material biológico**

Abelhas forrageiras das espécies *T. angustula*, *S. postica* e *M. scutellaris* foram coletadas de três colônias não irmãs ambientadas no meliponário experimental do grupo de pesquisa Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAs), Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de São Carlos (Via Anhanguera, Km 174 – Área rural, Araras – SP). As colmeias usadas para a realização dos testes estavam em condições de sanidade previamente conhecidas, estando em condições fisiológicas normais, livre de doenças e com rainha em franca postura, de acordo com o estabelecido pelo protocolo definido pela OCDE (1998a) para a determinação da toxicidade oral de agrotóxicos.

As abelhas foram coletadas diretamente da entrada das colmeias com o auxílio das gaiolas experimentais furadas lateralmente para circulação de ar. Após a coleta de 540 abelhas forrageiras de cada espécie, as mesmas foram levadas para o laboratório e colocadas em uma incubadora de Demanda Bioquímica por Oxigênio, com temperatura em  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $70 \pm 5\%$  com oferta de xarope feito de açúcar e água destilada (m/v 1:1) até o início dos testes, que ocorreram após um período de adaptação de 24 horas.



As abelhas foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais, sendo para cada espécie testada 90 abelhas destinadas aos grupos controle e 450 abelhas expostas a concentrações do inseticida.

### **2.1.2. Bioensaios de toxicidade**

Para a obtenção das concentrações do inseticida neonicotinóide tiametoxam a partir do produto comercial Actara® WG 250 (25.0% i.a.) foi preparada uma solução mãe com contendo 1.000 ng i.a./ $\mu$ L e dela realizadas diluições seriadas em xarope de açúcar cristal e água destilada (1:1 w:v) até as concentrações de: 0,3, 0,2, 0,13, 0,08, e 0.06 ng a.i./ $\mu$ L.

Tais concentrações foram definidas com base em dados disponíveis na literatura para a espécie *A. mellifera* e abelhas sem ferrão do mesmo gênero que as aqui avaliadas (OLIVEIRA et al., 2014; QUIROGA - MURCIA et al., 2017; MOREIRA et al., 2018; JACOB et al., 2019; KUMAR; SINGH; NAGARAJAIAH, 2020; U.S. EPA ECOTOX knowledgebase, 2022; PPDB: Pesticide Properties DataBase, 2022).

## **2.2. Determinação da $Cl_{50}$ e da $DL_{50}$ oral**

Os bioensaios realizados no presente trabalho seguiram os protocolos definidos por Nocelli et al. (2018) (submetido. Projeto CNPq 400540/2018), desenvolvido de acordo com os estabelecidos pela OCDE (1998a,1998b) em abelhas da espécie *A. mellifera*.

Após o período de adaptação em BOD em temperatura em  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $70 \pm 5\%$ , as abelhas das espécies *T. angustula* e *S. postica*, foram expostas oralmente aos agrotóxicos partir de alimentador constituído por um microtubo de polipropileno de 1,5 mL com furos ao lado. Foi oferecido xarope não contaminado aos grupos controle e xarope contaminado aos grupos submetidos aos cinco tratamentos contendo as concentrações do inseticida até a finalização do bioensaio. O peso dos alimentadores foi aferido para a determinação da  $DL_{50}$ , sendo por 24 e 48 horas após a exposição aferidas a quantidade de abelhas mortas e comportamentos anormais.

Para ajuste das concentrações, foram realizados ao menos três testes preliminares para uma das espécies. Os experimentos constituíram em três replicatas por tratamento, cada uma composta por uma gaiola experimental com 10 abelhas, sendo validados quando apresentaram menos que 10% mortalidade nos grupos controle.

## **3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Dados do tipo dose – resposta apresentam distribuição binomial e são melhores analisados utilizando modelos lineares generalizados (GLM) (FINNEY, 1971; KERR; MEADOR, 1996; DE CARVALHO et al., 2017). Portanto, para avaliar os dados referentes a exposição oral do tiametoxam em 24 horas foram utilizados modelos lineares generalizados, com o auxílio do ambiente estatístico R (R core team 2020). Foram testadas as funções de ligação logit, probit e os complementos log – log e cauchy, sendo a função de ligação logit escolhida por melhor ter se ajustado aos dados.

Para o cálculo da DL<sub>50</sub> em relação ao consumo (ng i.a./abelha) o consumo médio diário de alimento por abelha foi multiplicado pelo valor da CL<sub>50</sub> encontrado na análise estatística. Já para a determinação da DL<sub>50</sub> em relação ao peso (ng i.a./g abelha), o valor da DL<sub>50</sub> achada em relação ao consumo foi dividido pela massa corporal em gramas de cada espécie, utilizando valores obtidos do trabalho realizado por Dorigo et al. (2018). Os valores referentes a toxicidade do tiametoxam para a abelhas *A. mellifera* foram retirados do trabalho realizado por Oliveira et al. (2014).

Com esses valores de toxicidade realizamos curvas de distribuição de sensibilidade entre as espécies (SSD) utilizando a calculadora do Excel desenvolvida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA) denominada “Species Sensitivity Distribution Generator, além de calcular a razão de sensibilidade (R) “sensitivity ratio” entre os valores obtidos para a abelha *A. mellifera* e para as espécies de abelhas sem ferrão (ARENA ; SGOLASTRA, 2014)

#### 4. RESULTADOS

Os valores de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub> oral para o inseticida tiametoxam em 24 horas de exposição foram de: 0,329 ng i.a./μL, 1,677 ng i.a./abelha e 409,24 ng i.a./g de abelha para *T. angustula*; 0,624 ng i.a./μL, 5,553 ng i.a./abelha e 329,647 ng i.a./g de abelha para *S. postica*; 0,215 ng i.a. /μL, 3,254 ng i.a. /abelha e 42,452 ng i.a./g de abelha para *M. scutellaris*. Os valores achados por Oliveira et al. (2014) para a espécie *A. mellifera* em relação a CL<sub>50</sub> oral em 24 horas de exposição foi de of 4,28 ng i.a./μL; utilizando esses dados para a determinação da DL<sub>50</sub> em relação ao consumo e peso corpóreo foram achados os valores de 214 ng i.a./abelha e 2,705 ng i.a./g de abelha (Tabela 1).

**CL<sub>50</sub>**

**DL<sub>50</sub>**

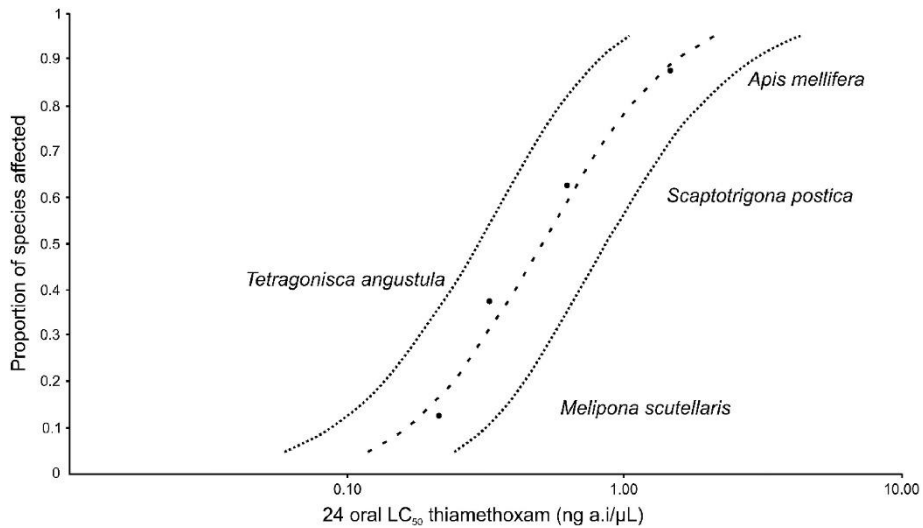
**DL<sub>50</sub>**

| Espécies             | (ng a.i./ $\mu$ L) | (ng a.i./abelha) | (ng a.i./g de abelha)   |
|----------------------|--------------------|------------------|-------------------------|
| <i>Tetragonisca</i>  | 0,329              | 1,677            | 409,024                 |
| <i>angustula</i>     | (0,232 – 0,336)    | (1,183 – 1,713)  | (288,536 – 417,951)     |
| <i>Scaptotrigona</i> | 0,624              | 5,553            | 329,647                 |
| <i>postica</i>       | (0,192 – 1,214)    | (1,708- 10,804)  | (100,470 – 635,529)     |
| <i>Melipona</i>      | 0,215              | 3,254            | 42,452                  |
| <i>scutellaris</i>   | (0,181 – 0,250)    | (2,733 – 3,776)  | (35,960 – 49,684)       |
| <i>Apis</i>          | 4,28               | 214              | 2.705                   |
| <i>Mellifera</i> *   | (3,95 – 4,61)      | (197,5 – 230,5)  | (2.496,839 – 2.914,032) |

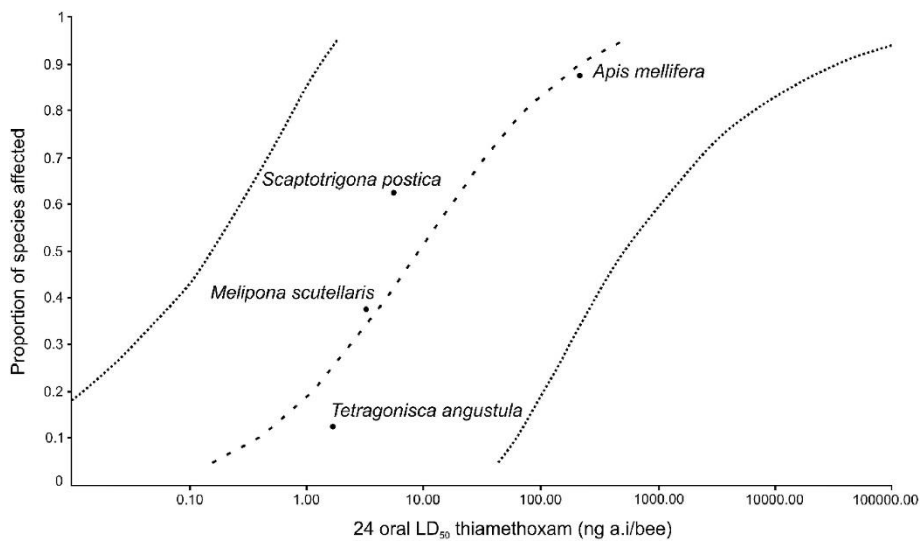
**Tabela 1.** Toxicidade oral do inseticida tiametoxam para as espécies estudadas em 24 horas com Intervalos de Confiança em 95%. \*Os dados de toxicidade, consumo e peso corpóreo da abelha *A.mellifera* foram obtidos de Oliveira et al. (2014) e Dorigo et al. (2018).

O peso corporal e consumo diário das abelhas sem ferrão testadas e da espécie *A. mellifera* se dão presentes em ordem crescente:  $4,1 \times 10^{-3}$  g de massa corporal e  $5,1 \mu\text{L}/\text{abelha}$  por dia para *T. angustula*;  $1,7 \times 10^{-2}$  g de massa corporal e  $8,9 \mu\text{L}/\text{abelha}$  por dia para *S. postica*;  $7,6 \times 10^{-2}$  g de massa corporal e  $15,1 \mu\text{L}/\text{abelha}$  por dia para *M. scutellaris*;  $7,9 \times 10^{-2}$  g de massa corporal e  $50 \mu\text{L}/\text{abelha}$  para *A. mellifera*.

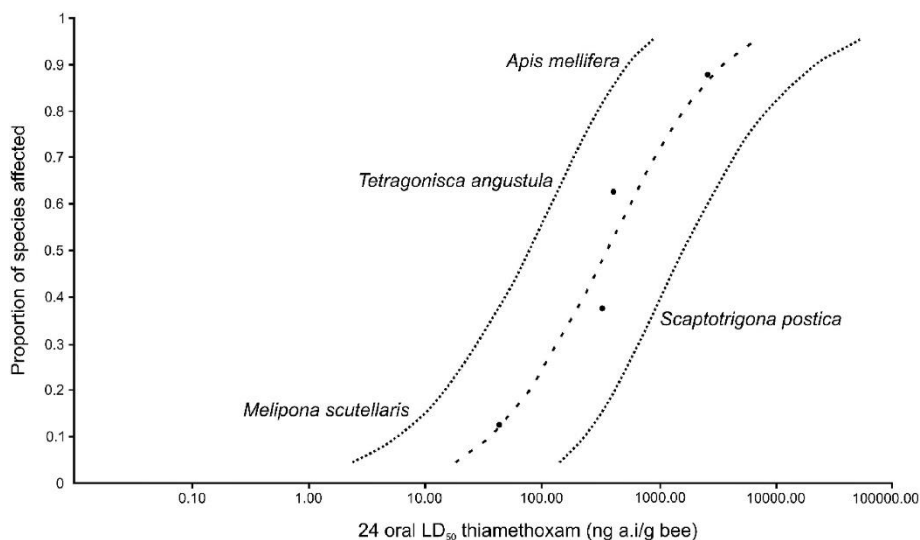
As curvas de distribuição de sensibilidade entre as espécies foram diferentes dependendo da unidade usada para representar a toxicidade do inseticida. A sensibilidade das abelhas em 24 horas, dá mais sensível para a menos sensível, está representada a seguir:  $\text{CL}_{50}$  (ng i.a./ $\mu\text{L}$ ): *M. scutellaris* > *T. angustula* > *S. postica* > *A. mellifera* (Figura 1);  $\text{DL}_{50}$  (ng i.a./abelha): *T. angustula* > *M. scutellaris* > *S. postica* > *A. mellifera* (Figura 2);  $\text{LD}_{50}$  (ng i.a./g abelha): *M. scutellaris* > *S. postica* > *T. angustula* > *A. mellifera* (Figura 3).



**Figura 1.** Curva de distribuição da sensibilidade entre as espécies. ○ representa valores de CL<sub>50</sub> (ng i.a./µL) em 24 horas de exposição com Intervalo de Confiança de 95%.



**Figura 2.** Curva de distribuição da sensibilidade entre as espécies. ○ representa valores de DL<sub>50</sub> (ng i.a./abelha) em 24 horas de exposição com Intervalo de Confiança de 95%.



**Figura 3.** Curva de distribuição da sensibilidade entre as espécies. ○ representa valores de DL<sub>50</sub> (ng i.a./g de abelha) em 24 horas de exposição com Intervalo de Confiança de 95%.

A razão de sensibilidade (R), calculada a partir dos valores de DL<sub>50</sub> em ng i.a./abelha e ng i.a./g abelha foram, respectivamente de: 127,6 e 6,613 para *T. angustula*; 38,55 e 8,2 para *S. postica*; e para *M. scutellaris* 65,7 e 63,71.

Quando o fator de segurança baseado em 10 recomendado pela Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) é aplicado aos valores de DL<sub>50</sub> em ng i.a./abelha, temos que todas as abelhas não são representadas pela espécie modelo. Já quando aplicado aos valores de DL<sub>50</sub> em ng i.a./g de abelha, o cenário muda, sendo as abelhas das espécies *T. angustula* e *S. postica* protegidas pela espécie modelo, enquanto a espécie *M. scutellaris* não.

## 5. DISCUSSÃO

Estabelecemos a toxicidade oral do tiametoxam para espécies de abelhas sem ferrão, *T. angustula*, *S. postica* e *M. scutellaris*, usando consumo e massa corporal para determinar os valores de DL<sub>50</sub>. As espécies testadas apresentaram valores variados de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub>, sendo altamente tóxico para todas em 24 horas de exposição (< 2 µg/abelha) (USEPA, 2017). Os valores de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub> oral e tópico de inseticidas neonicotinoides são geralmente menores em relação a outros tipos de inseticida, e conseqüentemente, são mais tóxicos para as abelhas (GOULSON, 2020; TOSI et al., 2022). Essa classe de agrotóxicos

atua no sistema nervoso central dos insetos, ligando-se aos receptores nicotínicos da acetilcolina, e por conta desse mecanismo seus efeitos letais e subletais em abelhas são bem conhecidos (JACOB et al., 2019; SGOLASTRA et al., 2020, PISA et al., 2021).

Nossos dados corroboram com estudos que encontraram grande susceptibilidade desse grupo de abelhas a neonicotinoides e outros tipos de inseticidas quando são comparados com os disponíveis para *A. mellifera* (ARENA; SGOLASTRA, 2014; DEL SARTO et al., 2014; QUIROGA – MURCIA et al., 2017; JACOB et al., 2019; BRIGANTE et al., 2021; MIOTELO et al., 2021). A curva de distribuição da sensibilidade entre as espécies obtidas mostra que as abelhas sem ferrão são mais sensíveis que *A. mellifera*, independente da maneira em que as doses letais são calculadas.

Quando o fator de segurança baseado em 10 é usado para avaliar a representatividade da espécie modelo em relação a espécies nativas é aplicado, temos que a espécie *M. scutellaris* não é representada pela espécie *A. mellifera* em nenhuma das abordagens aqui utilizadas. As espécies *T. angustula* e *S. postica* não são representadas pelo fator de segurança quando o apenas o consumo é levado em consideração e representado quando o peso corporal é. Para uma análise mais conservadora, Thompson et al. (2016) recomenda a aplicação de um fator de segurança baseado em 5 é para dados de DL<sub>50</sub> que levam em consideração o peso corporal. Ao aplicar esse fator de segurança em nossos dados temos que os presentes protocolos não protegem as abelhas testadas no presente experimento.

Além disso, nossos resultados demonstram diferentes cenários para a toxicidade das espécies de abelhas sem ferrão quando o consumo diário e o peso corporal foram considerados para determinar os valores de DL<sub>50</sub>. O valor de DL<sub>50</sub> definido em relação ao consumo (ng i.a./abelha) para a espécie *T. angustula* demonstrou uma toxicidade superior às demais espécies, sendo mais suscetível ao tiametoxam do que *M. scutellaris* e *S. postica*. Essa situação se justifica porque a ingestão de alimentos é diretamente proporcional ao tamanho corporal da abelha (THOMPSON, 2001; DORIGO et al., 2018; WARD et al., 2022). No entanto, quando o peso corporal (ng i.a./g abelha) foi levado em consideração na determinação da DL<sub>50</sub>, tivemos um cenário mais consistente com as taxas de mortalidade apresentadas nos bioensaios, sendo menor a toxicidade ao tiametoxam para *T. angustula*, seguido por *S. postica* e *M. scutellaris*, que foi a espécie mais afetada.

Utilizando a perspectiva da massa corporal, abelhas menores como *T. angustula* são menos afetadas pela exposição aos agrotóxicos, enquanto abelhas maiores como *M. scutellaris* são mais afetadas, refutando dados que demonstram maior susceptibilidade de abelhas menores em relação a abelhas de maior tamanho (THOMPSON, 2001; POQUET; VIDAU; ALAUX; 2016; UHL et al., 2016). Diferenças no metabolismo das abelhas, e na filogenia em relação aos mecanismos de desintoxicação podem ser fatores chave para explicação desses padrões (WARD et al., 2022; HASS et al., 2022).

Dentre as mais importantes características de um organismo está o tamanho corporal; que é um determinante para a fisiologia e outros atributos de uma espécie (RAO et al., 2021). Quando a massa corporal é considerada para determinar o metabolismo de vertebrados e invertebrados, a razão metabólica é considerada inversamente proporcional ao tamanho (GRULA et al., 2021; WARD et al., 2022). Tal situação é explicada pela curva denominada “mouse – to – elephant curve” (RAO, 2021), significando que abelhas maiores possuem uma menor razão metabólica por grama, enquanto abelhas menores possuem maior razão metabólica por grama. Como exemplo, temos que o tamanho junto a algumas propriedades morfológicas dão benefícios energéticos em relação ao voo a abelhas pequenas como *T. angustula* devido a maior razão metabólica por massa corporal (DUELL et al., 2022). A relação entre massa corporal e razão metabólica pode implicar em um processo de desintoxicação mais rápido, como observado por Ward et al. (2022). Sugerimos aqui, portanto, que a maior ou menor sensibilidade ao tiametoxam pode estar relacionado a fatores metabólicos dessas abelhas.

Outra hipótese que explica a menor susceptibilidade de abelhas de tamanho pequeno como *T. angustula*, são as diferenças filogenéticas entre os grupos de abelhas em relação as enzimas de desintoxicação. Os insetos da ordem Hymenoptera, especialmente abelhas, possuem um número reduzido de genes que codificam enzimas de desintoxicação a xenobióticos como agrotóxicos (CLAUDIANOS et al., 2016; HASS et al., 2022). O número reduzido desses genes impacta a função de três superfamílias de enzimas de desintoxicação, sendo elas: glutathione-S-transferase (GST), citocromo P450 monooxigenase (P450) e carboxil colinesterases (CCE) (CLAUDIANOS et al., 2016; MAJON et al., 2016). Em Hass et al. (2022), foi achada a conservação do papel funcional de genes relacionados a enzima CYP9Q (Subfamília de enzimas do tipo citocromo P450 monooxigenase) para a maior parte dos grupos de abelhas analisados, sendo essas

capazes degradar inseticidas neonicotinoides, mas esses não são universais em todas as espécies de abelhas, como demonstrado para algumas espécies do gênero *Megachile*.

Afirmamos que a questão da massa corporal é uma boa maneira de avaliar a sensibilidade de organismos não alvo como espécies de abelhas em relação aos agrotóxicos, uma vez que dá a dose administrada do agrotóxico por grama de abelha. Essa abordagem é usada para vertebrados em testes de toxicidade, e dão cenários mais realistas em relação a exposição (THOMPSON, 2016; THOMPSON; PAMMINGER, 2019; DE MONTAIGU; GOULSON, 2020; PAMMINGER, 2020). Sendo, por tanto, necessário o desenvolvimento de estudos e protocolos que considerem essa característica em relação as abelhas, identificando assim qual é a abordagem ideal para quantificar a toxicidade oral de agrotóxicos nesses polinizadores (LEWIS; TZILIVAKIS, 2019; PAMMINGER, 2020; TAI et al., 2022).

Destacamos que diferenças entre a massa corporal em espécies de abelhas sem ferrão são essenciais para identificar o risco de agrotóxicos ao grupo dos meliponíneos, uma vez que possuem uma grande variação em relação a essa característica, existindo abelhas com pesos corporais entre  $1,0 \times 10^{-3}$  e  $1,5 \times 10^{-1}$  gramas (THOMPSON, 2016; CHAM et al., 2019; THOMPSON; PAMMINGER; 2019; SCHMOLKE et al., 2021; DUELL et al., 2022). Para representar essas abelhas no processo de Avaliação de Risco Ambiental de agrotóxicos é necessário o uso de espécies de tamanho variado no desenvolvimento dos testes ecotoxicológicos. Sendo assim possível a realização de outras etapas do processo em que são desenvolvidos estudos de semi - campo e campo que avaliam o impacto em populações desses polinizadores, uma vez que a vulnerabilidade aos agrotóxicos vai além de testes individuais em condições de laboratório.

## **6. CONCLUSÃO**

A massa corporal em gramas é um fator essencial para avaliar a sensibilidade de abelhas em relação a agrotóxicos, uma vez que essa abordagem foi mais condizente com os dados de mortalidade encontrados nos bioensaios realizados no presente trabalho.

Nós também concluímos que dados moleculares a respeito da presença de enzimas de desintoxicação em abelhas dos gêneros *Melipona*, *Scaptotrigona* e *Tetragonisca* são escassos para realização de inferências sobre o assunto e melhor



entender os impactos dos agrotóxicos nesse grupo de abelhas, especialmente no caso da abelha *M. scutellaris* e outras espécies do gênero que estão atualmente ameaçadas.

O presente trabalho suporta a hipótese de que o presente processo de Avaliação de Risco Ambiental em relação a agrotóxicos para polinizadores no Brasil não é protetivo para a biodiversidade de abelhas sem ferrão encontradas no país. Essas abelhas estão passando por uma diminuição em suas populações manejadas e silvestres devido ao efeito de agrotóxicos e outros estressores, sendo muitas delas encontradas em risco de extinção. O uso da espécie *A.mellifera* como modelo biológico é equivocado e não representa os efeitos de toxicidade de agrotóxicos em abelhas sem ferrão, ameaçando assim os serviços de polinização em áreas naturais e agrícolas, bem como a conservação de espécies vegetais e animais.

O registro de novos ingredientes ativos no país atinge números recordes a cada ano, o que somado a falta de orientação técnica adequada, supervisão, fiscalização e práticas amigáveis aos polinizadores, criam um cenário devastador, e fazem deste um tema de pesquisa urgente, uma vez que o desenvolvimento de trabalhos como o apresentado colaboram para o desenvolvimento de esquemas de avaliação de risco mais representativas a biodiversidade de abelhas sem ferrão encontradas nos biomas brasileiros.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENA, M.; SGOLASTRA, F.A. meta – analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, 23(3), 324 – 334, 2014.

BIRELEY, R. et al. Preface: Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non –Apis bees. **Environmental entomology**, 48(1), 1 – 3. 2019.

BOYLE, N. K. et al. Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non – Apis bees: foundation and summaries. **Environmental entomology**, 48(1), 4 – 11, 2019.

BRIGANTE, J. et al. Acute toxicity of the insecticide abamectin and the fungicide difenoconazole (individually and in mixture) to the tropical stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology**, 30(9), 1872 –1879, 2021.

BRÜHL, C. A; ZALLER, J. G. Biodiversity decline as a consequence of an inappropriate environmental risk assessment of pesticides. **Frontiers in Environmental Science**, 177. 2019.

CHAM, K. O. et al, 2019. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental entomology**, 48(1), 36 –48, 2019.

CLAUDIANOS, C. et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology** 15, 615–636, 2006.

DANGLES, O.; CASAS, J. Ecosystem services provided by insects for achieving sustainable development goals. **Ecosystem services**, 35, 109 –115. 2019

DE ASSIS, J. C. et al. Are native bees in Brazil at risk from the exposure to the neonicotinoid imidacloprid? **Environmental Research**, 212, 113127, 2022.

DE CARVALHO, J. R. et al. **Análise de probit aplicada a bioensaios com insetos**. Colatina: IFES, 2017. 102p.

DECOURTYE, A. et al. Toward the protection of bees and pollination under global change: present and future perspectives in a challenging applied science. **Current opinion in insect science**, 35, 123 –131, 2019.

DEL SARTO, M.C.L. et al. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie** 45, 626–636, 2014

DEMORTAIN, D. The science behind the ban: the outstanding impact of ecotoxicological research on the regulation of neonicotinoids. **Current Opinion in Insect Science**, 46, 78 – 82. 2021.

DIETZSCH, A. C.; JÜTTE, T. Non –*Apis* bees as model organisms in laboratory, semi –field and field experiments. **Journal für Kulturpflanzen**, 72(5), 162 –172, 2020.

DORIGO, A. et al. Biological data of stingless bees with potential application in pesticide risk assessments. **Sociobiology**, 65(4), 777 –779. 2018.

DUELL, M. E. et al. Size –Dependent scaling of stingless bee flight metabolism reveals an energetic benefit to small body size. **Integrative and Comparative Biology**. 2022.

ECOTOX knowledgebase – U.S. EPA, 2022. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ecotox/> . Acessado em: 12 de ago 2020.

GEMMILL –HERREN, B.et al. Building effective policies to conserve pollinators: translating knowledge into policy. **Current Opinion in Insect Science**, 46, 64 –71. 2021.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 272 p

GOULSON, D. 2020. Pesticides, Corporate Irresponsibility, and the Fate of Our Planet. **One Earth** 2, 302–305. 2020

GRADISH, A. et al. 2019. Comparison of pesticide exposure in honey bees (Hymenoptera: Apidae) and bumble bees (Hymenoptera: Apidae): implications for risk assessments. **Environmental Entomology**, 48(1), 12 –21, 2019.

GRULA, C. C. et al. Body size allometry impacts flight –related morphology and metabolic rates in the solitary bee *Megachile rotundata*. **Journal of Insect Physiology**, 133, 104275, 2021.

HAAS, J. et al. Phylogenomic and functional characterization of an evolutionary conserved cytochrome P450 –based insecticide detoxification mechanism in bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 119(26), e2205850119, 2022.

HIPÓLITO, J. et al. Legislation and pollination: Recommendations for policymakers and scientists. **Perspectives in Ecology and Conservation**, 19(1), 1 –9, 2021

IPBES: Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science – Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services. **IPBES secretariat**, Bonn, Germany. 1148 pages, 2019.

JACOB, C. R., et al. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, 28(7), 744 –753., 2019

KERR, D. R.; MEADOR, J. P. Modeling dose response using generalized linear models. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 15, n. 3, p. 395-401, 1996.

KEMMERLING, L. R.; GRIFFIN, S. R.; HADDAD, N. M, 2021. Optimizing pollinator conservation and crop yield among perennial bioenergy crops. **GCB Bioenergy**, 13(7), 1030 –1042, 2021.

KRÖGER, M. **Extractivisms, existences and extinctions: Monoculture plantations and Amazon deforestation**. p. 176. Taylor & Francis., 2022.

KUMAR, G. SINGH, S.; NAGARAJAIAH, R. P. K. **Detailed Review on Pesticidal Toxicity to Honey Bees and Its Management. Modern Beekeeping –Bases for Sustainable Production**. Intech open. 2020.

LEWIS, K.A.; TZILIVAKIS, J. Wild Bee Toxicity Data for Pesticide Risk Assessments. **Data** 4, 98, 2019.

LIMA, M. A., et al. Agrochemical –induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of Comparative Physiology A**, 202(9), 733 –747., 2016.

LÓPEZ-URIBE, M. M. Wild Bees: Diversity, Ecology, and Stressors of Non-Apis Bees. **Honeybee Medicine for the Veterinary Practitioner**, 81 –91, 2021

MANJON, C., et al. Unravelling the Molecular Determinants of Bee Sensitivity to Neonicotinoid Insecticides. **Current Biology** 28, 1137–1143.e5, 2018

MIOTELO, L. et al. Apis mellifera and Melipona scutellaris exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, 268, 115770. 2021.

MOREIRA, D. R. et al. Toxicity and effects of the neonicotinoid thiamethoxam on *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae). **Environmental toxicology**, 33(4), 463 –475, 2018.

OLIVEIRA, R. A. et al. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental toxicology**, 29(10), 1122 –1133. 2014

OLIVEIRA, G.L.T. Political ecology of soybeans in South America. In *Political Ecology of Industrial Crops* (pp, 201 –220). **Routledge**, 2021.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (1998a) **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Honeybees, Acute Oral Toxicity Test 213/** Adopted Sep. 21, 1998.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (1998b) **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Honeybees, Acute Contact Toxicity Test 214/** Adopted Sep. 21, 1998.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (2017a). **OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Honey Bee (*Apis mellifera*), Chronic Oral Toxicity Test (10 –day Feeding)**. OECD/OCDE 245. Adopted Oct. 9, 2017.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (2016). **Guidance Document on Honey Bee Larval Toxicity Test following Repeated Exposure**. Series on Testing ; Assessment No. 239. ENV/JM/MONO (2016) 34.

PAMMINGER, T. Extrapolating Acute Contact Bee Sensitivity to Insecticides Based on Body Weight Using a Phylogenetically Informed Interspecies Scaling Framework. **Environmental Toxicology and Chemistry** 40, 2042–2050, 2021.

PATEL, V. et al. Why bees are critical for achieving sustainable development. **Ambio**, 50(1), 49–59, 2021.

PISA, L. et al. An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research**, 28(10), 11749–11797, 2021.

POQUET, Y.; VIDAU, C.; ALAUX, C. Modulation of pesticide response in honeybees. **Apidologie** 47, 412–426, 2016.

PPDB: Pesticide Properties DataBase - **University of Hertfordshire**, 2022. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/> Acessado em: 15 ago de 2020.

QUIROGA –MURCIA, D. E. et al Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). **Agronomía Colombiana**, 35(3), 340–349, 2017.

RAO, T. R. Body size matters in the lives of organisms. **Resonance**, 26(1), 61–71, 2021.

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

SALES, V. R. A systematic review of research conducted by pioneer groups in ecotoxicological studies with bees in Brazil: advances and perspectives. **Environmental Science and Pollution Research**, 1–22, 2022

SÁNCHEZ – BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological conservation**, 232, 8–27.2019

SCHMOLKE, A. et al. Assessment of the vulnerability to pesticide exposures across bee species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 40(9), 2640–2651, 2021

SGOLASTRA, F. et al. Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, 241, 108356, 2020

SIVITER, H.; RICHMAN; S. K.; MUTH, F. Field-realistic neonicotinoid exposure has sub-lethal effects on non-*Apis* bees: A meta-analysis. **Ecology Letters**, 24(12), 2586–2597, 2021.

STRUELENS, Q.; SILVIE, P. Orienting insecticide research in the tropics to meet the sustainable development goals. **Current opinion in insect science**, 40, 24–30, 2020

TAI, F. K. et al. Honey bee toxicological responses do not accurately predict environmental risk of imidacloprid to a solitary ground –nesting bee species. **Science of The Total Environment**, 156398, 2022

MONTAIGU T. C, GOULSON D. Identifying agricultural pesticides that may pose a risk for birds. **PeerJ** 8:e9526, 2020.

THOMPSON, H. M.; PAMMINGER, T. Are honeybees suitable surrogates for use in pesticide risk assessment for non-Apis bees? **Pest management science**, 75(10), 2549 – 2557, 2019.

THOMPSON, H. M. Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.). **Apidologie**, 32(4), 305 –321, 2001

THOMPSON, H. Extrapolation of acute toxicity across bee species. **Integrated environmental assessment and management**, 12(4), 622 –626, 2016.

TOLEDO – HERNÁNDEZ, E. et al. The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. **Apidologie**, 53(1), 1 –23, 2022

TOSI, S. et al. Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta – analysis and new risk assessment tools. **Science of The Total Environment**, 156857, 2022.

UHL, P. et al. A. Interspecific sensitivity of bees towards dimethoate and implications for environmental risk assessment. **Scientific reports**, 6(1), 1 –7, 2016.

USEPA. Technical Overview of Ecological Risk Assessment – Analysis Phase: Ecological Effects Characterization, 2017, Disponível em: [:https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0](https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0).  
Acessado em 12 de set 2022

VIANA –SILVA, F. et al. Selection matrix for Brazilian bee species to risk assessment of pesticides. **Julius –Kühn –Archiv**, 462, 56 –61, 2018.

WARD, L. T. et al. Pesticide exposure of wild bees and honey bees foraging from field border flowers in intensively managed agriculture areas. **Science of The Total Environment**, 831, 154697, 2022

WILLIAMS, N. M. et al. Ecological and life –history traits predict bee species responses to environmental disturbances. **Biological Conservation**, 143(10), 2280 –2291. 2010.

WOOD, S. L. Distilling the role of ecosystem services in the Sustainable Development Goals. **Ecosystem services**, 29, 70 –82, 201

## CAPÍTULO 2

### Interações entre agrotóxicos alteram a toxicidade do neonicotinóide tiametoxam em abelhas sem ferrão

Ana Paula Salomé Lourencetti<sup>a</sup>, Patricia Azevedo<sup>b</sup>, Roberta Cornélio Ferreira Nocelli<sup>c</sup>

#### RESUMO

As abelhas sem ferrão são frequentemente expostas a combinações de pesticidas quando forrageiam culturas agrícolas em épocas de floração. Uma vez que agrotóxicos considerados não tóxicos como fungicidas e herbicidas podem desviar do efeito aditivo esperado para os componentes de uma mistura, causando maior ou menor efeito de toxicidade para os inseticidas neonicotinóides, é de suma importância a produção de informações a respeito. No presente trabalho, encontramos toxicidade oral do tiametoxam para duas espécies de abelhas sem ferrão em combinações binárias de um fungicida e um herbicida em dose única em 24 e 48 horas, avaliando possíveis interações entre eles em 24 horas de exposição. Os resultados sugerem que o herbicida glifosato não interage com o inseticida tiametoxam, uma vez que as combinações apresentaram uma razão média estimada igual a um. Enquanto o tebuconazol interagiu, suas combinações têm uma razão média estimada acima de um, excedendo os efeitos aditivos esperados da mistura, aumentando a toxicidade. Com os resultados aqui obtidos reforçamos a maior sensibilidade das abelhas sem ferrão em relação à espécie modelo *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae), bem como a necessidade de considerar a massa corporal das espécies testadas para determinação da Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>). Colaboramos com informações sobre os efeitos das combinações de agrotóxicos em abelhas sem ferrão, assunto pouco explorado na literatura científica. Ressaltamos que as misturas de agrotóxicos não passam por regulamentação, evidenciando assim a necessidade de ações de curto e longo prazo para mitigar os impactos sobre esses polinizadores e outros organismos não-alvo.

**Palavras – Chave:** Triazóis, neonicotinóides, efeitos sinérgicos, desintoxicação.

## ABSTRACT

Stingless bees are frequently exposed to combinations of pesticides when foraging flowering crops. Since pesticides considered non-toxic such as fungicides and herbicides can deviate from the expected additive effect for the components of a mixture, causing greater or lesser toxicity effects for insecticides neonicotinoids, it is of paramount importance to produce information about it. In the present work, we found oral toxicity at 24 and 48 hours of Thiamethoxam for two species of stingless bees in binary combinations of a fungicide and an herbicide in a single dose, evaluating possible interactions between them at 24 hours of exposure. The results suggest that the herbicide Glyphosate does not interact with the insecticide Thiamethoxam because their combinations showed an estimated mean ratio equal to one. While Tebuconazole does, their combinations have estimated mean ratio above one, exceeding the expected additive effects of the mixture and thus increased toxicity. We also reinforce the greater sensitivity of stingless bees concerning the model species *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) and the need to consider the body mass of the tested species to Lethal Median Dose (LD<sub>50</sub>) determination. We collaborate with information about pesticides combinations effects on stingless bees, subject little explored in the scientific literature, emphasizing that pesticide mixtures do not go through regulation, thus highlighting the need for short and long-term actions to mitigate impacts on these native pollinators and other non-target organisms.

**Keywords:** Triazoles, neonicotinoids, synergistic effects, detoxification.



## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas são extremamente importantes para as contribuições da natureza para as pessoas (do inglês Nature Contribution to People – NPC), uma vez que se destacam como polinizadoras de grande parte de plantas com flores do mundo (IPBES 2019., KLEIN et al., 2020). O termo NPC, que engloba todo o provimento da natureza viva, sejam eles positivos ou negativos, e que impactam na qualidade de vida dos seres humanos, foi cunhado por Diaz et al. (2015) e se tornou um dos principais tópicos da Plataforma de Política Científica Intergovernamental sobre Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos (IPBES). Além do alto valor agregado à polinização e da manutenção da variabilidade genética vegetal, as abelhas, principalmente as nativas, estão intimamente relacionadas aos aspectos culturais e sociais da população (POTTS et al., 2016; GONZALES et al., 2018; QUEZADA-EUAN, 2018).

O uso indiscriminado de agrotóxicos, relacionado ao processo de intensificação da agricultura convencional ao longo dos últimos anos (ELLIS, 2020; GOULSON, 2020), causa grande impacto nesses polinizadores devido aos seus efeitos letais e subletais (PISA et al., 2015; VAN DER SLUIJS, 2015, SPONSLER et al., 2019). Tais efeitos podem ser agravados quando diferentes classes de agrotóxicos são misturadas através da preparação de misturas em tanque, utilização de produtos formulados com mais de um ingrediente ativo e aplicações sucessivas durante as floradas (ZALLER; BRÜHL, 2019; TOPPING; ALDRICH; BERNY, 2020), que são comuns por serem consideradas opções rápidas e econômica por muitos agricultores para conter o avanço de pragas e doenças em monoculturas (VIECELLI et al., 2019; FERNANDES et al., 2020; GAZZIERO et al., 2021).

Tais práticas podem agravar os efeitos deletérios desses produtos nas abelhas, pois ao serem expostas a essas combinações diferentes vias moleculares e celulares são atingidas, o que pode ocasionar interações entre os componentes das misturas. Elas são definidas quando o efeito aditivo esperado para a combinação é desviado, causando aumento (sinergismo) ou diminuição (antagonismo) da toxicidade (HERNÁNDEZ; GIL; LACASANA, 2017; HAN et al., 2019; TOSI et al., 2022). Interações toxicológicas podem ocasionar efeitos tanto a nível individual quanto de colônia, tais como alterações no comportamento, morfologia, fisiologia, forrageamento e sobrevivência (GILL; RAMOS;

RAINE, 2012; BÖHME et al., 2016; SGOLASTRA et al., 2018; PRADO et al., 2019; ALMASRI et al., 2020).

Dentre as inúmeras combinações possíveis nas misturas, as que ocorrem com inseticidas neonicotinoides merecem destaque, uma vez que são altamente tóxicos para abelhas e quando em combinações binárias e ternárias com fungicidas e herbicidas em bioensaios laboratoriais apresenta aumento em sua toxicidade (SGOLASTRA et al., 2018; DA COSTA DOMINGUES et al., 2020; WANG, ZHU; LI, 2020; ALMASRI et al., 2020; DOS SANTOS ARAÚJO; BERNARDES; MARTINS, 2021).

Apesar dos inúmeros impactos causados em abelhas decorrentes do uso misturas, os bioensaios ecotoxicológicos usados no processo de Avaliação de Risco Ambiental não representam essas condições (TOSI; NIEH, 2019; SGOLASTRA et al., 2020; WEISNER et al., 2021). Em 2013/2014 a agência regulatória europeia – EFSA (European Food Safety Authority) – iniciou a discussão e o estabelecimento de métodos para um processo que seja realizado de forma holística, ou seja, abrangendo o uso de múltiplos estressores, estando entre eles a questão das misturas. Além disso, outro questionamento recorrentemente levantado é o fato de espécies nativas – mais sensíveis aos agrotóxicos – não serem consideradas nas avaliações de risco, lacuna que também é contemplada na avaliação holística (RORTAIS et al., 2017; MORE et al., 2021).

No Brasil a discussão sobre as lacunas no processo de avaliação de risco a agrotóxicos foi iniciada pelo IBAMA por meio da criação de um grupo técnico de trabalho, para discutir o desenvolvimento de procedimentos para o processo de avaliação de risco para polinizadores que sejam adequados a realidade do país (PIRES; TOREZANI, 2018). Tendo como resultado a nota técnica 02001.000062/2017-93 CCONP/IBAMA, que aponta diferentes lacunas de conhecimento em relação ao processo de Avaliação de Risco Ambiental em abelhas. Além disso, a chamada pública 32/2017 realizada pelo CNPq/MCTIC/IBAMA/Associação ABELHA levou ao financiamento de projetos de pesquisa que trabalham para preencher essas lacunas, como é o caso do levantamento de espécies nativas prioritárias para avaliação de risco e a produção de dados biológicos e toxicológicos a respeito desses polinizadores (PIRES; TOREZANI, 2018; DORIGO et al., 2018; CHAM et al., 2019; ROSA – FONTANA, 2021).

Vale ressaltar que o Brasil é um país tropical e por suas características possui a maior biodiversidade de abelhas sem ferrão do mundo, sendo encontradas mais de 244

espécies em seu território (SILVEIRA et al., 2002; PEDRO, 2014). Polinizadores de grande importância em regiões neotropicais, muitas vezes inseridos em paisagens formadas por mosaicos com áreas de monocultivo e fragmentos florestais (DAINESE et al 2019; GUTIÉRREZ – ARELLANO; MULLIGAN, 2020; LOPES et al., 2021), que aumenta o risco de exposição a misturas contendo neonicotinoides (SANCHEZ – BAYO et al., 2016; UHL ; BHRÜL, 2019; GAZZIERO et al., 2021; LEWIS et al., 2021) e conseqüentemente a sua sobrevivência, uma vez que essas abelhas apresentam maior sensibilidade em relação aos inseticidas do que a espécie modelo *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) (SALES et al., 2022).

Pouco se sabe sobre as abelhas sem ferrão e o efeito de misturas de classes de diferentes produtos formulados de agrotóxicos (TOMÉ et al., 2017; DOS SANTOS ARAÚJO; BERNARDES; MARTINS, 2021; BRIGANTE et al., 2021; TOSI et al., 2022). A determinação de endpoints de toxicidade são uma maneira de identificar interações nesse grupo de abelhas (CARNESECCHI et al., 2019; MORE et al., 2021; TOSI et al., 2022), e uma vez que dados demonstram maior sensibilidade desses polinizadores em relação a inseticidas neonicotinoides, é de grande importância a realização de estudos com espécies prioritárias e os efeitos de misturas contendo os mesmos (TOSI et al., 2022; SALES et al., 2022).

Dentro do contexto apresentado, o presente trabalho verificou em duas espécies de abelha sem ferrão, *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae) e *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) – consideradas possíveis modelos na Avaliação de Risco Ambiental brasileira – possíveis interações em combinações binárias do herbicida glifosato (Roundup Original® Mais) e do fungicida tebuconazol (Tebufort®) em relação a toxicidade do inseticida neonicotinoide tiametoxam (Actara® 250 WG) a partir da realização de bioensaios de Concentração Letal Mediana (CL<sub>50</sub>) oral e determinação da Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>) em 24 e 48 horas após a exposição.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Delineamento experimental**

Abelhas forrageiras das espécies *T. angustula* e *S. postica* foram coletadas de três colônias não irmãs ambientadas no meliponário experimental do grupo de pesquisa

Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAs), Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal de São Carlos (Via Anhanguera, Km 174 – Área rural, Araras – SP). As colmeias usadas para a realização dos testes estavam em condições de sanidade previamente conhecidas, estando em condições fisiológicas normais, livre de doenças e com rainha em franca postura, de acordo com o estabelecido pelo protocolo definido pela OCDE (1998a) para a determinação da toxicidade oral de agrotóxicos.

### **2.1.1. Material biológico**

As abelhas foram coletadas diretamente da entrada das colmeias com o auxílio das gaiolas experimentais furadas lateralmente para circulação de ar. Após a coleta de 600 abelhas forrageiras de cada espécie, as mesmas foram levadas para o laboratório e colocadas em uma incubadora de Demanda Bioquímica por Oxigênio (DBO), com temperatura em  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $70 \pm 5\%$  com oferta de xarope feito de açúcar e água destilada (m/v 1:1) até o início dos testes, que ocorreram após um período de adaptação de 24 horas.

As abelhas foram divididas aleatoriamente em seis grupos experimentais, sendo para cada espécie testada 120 abelhas destinadas aos grupos controle (CONT), 150 abelhas aos grupos que continham a combinação binária com o herbicida (GLI + TIA), 150 abelhas aos grupos continham a combinação binária com o fungicida (TEB + TIA) e 180 abelhas aos grupos que continham as concentrações do herbicida e do fungicida isolados.

### **2.1.2. Bioensaios de toxicidade**

Para determinar se o herbicida (Roundup Original® Mais 48% e.a.) e o fungicida (Tebufort® 20% a.i.) podiam ser considerados relativamente seguros para as abelhas sem ferrão testadas ( $DL_{50} > 11 \mu\text{g}/\text{abelha}$ ) (EFSA, 2017) testes limites foram desenvolvidos. Para tal, foram usadas três concentrações para cada um dos agrotóxicos:  $100 \mu\text{g i.a.}/\mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{g i.a.}/\mu\text{L}$  e  $1 \mu\text{g i.a.}/\mu\text{L}$ , obtidas a partir de uma solução mãe de  $1000 \mu\text{g i.a.}/\mu\text{L}$ .

Em relação as combinações, testamos cinco concentrações do tiametoxam (Actara® WG 250 25.0% i.a.), obtidas do trabalho realizado por Lourencetti, Azevedo & Nocelli, (em processo de submissão). Foram elas: 0,3, 0,2, 0,13, 0,08 e 0,06 ng i.a./ $\mu\text{L}$ , sendo preparadas a partir de uma solução mãe de  $1000 \text{ ng i.a.}/\mu\text{L}$ .

Durante a realização das diluições para cada concentração do inseticida, uma única dose contendo  $100 \mu\text{g i.a.}/\mu\text{L}$  do herbicida ou do fungicida foi adicionada. Essas combinações foram feitas colocando  $1000 \mu\text{L}$  da respectiva solução mãe de cada

agrotóxico a diluição prévia de cada concentração do inseticida, completando para 10.000 µL com xarope.

## **2.2. Teste limite**

Os bioensaios realizados no presente trabalho seguiram os protocolos definidos por Nocelli et al. (2018) (submetido. Projeto CNPq 400540/2018), desenvolvido de acordo com os estabelecidos pela OCDE (1998a,1998b) em abelhas da espécie *A. mellifera*.

Após o período de adaptação em DBO em temperatura em  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $70 \pm 5\%$ , as abelhas das espécies *T. angustula* e *S. postica*, foram expostas oralmente aos agrotóxicos partir de alimentador constituído por um microtubo de polipropileno de 1,5 mL com furos ao lado. Foi oferecido xarope não contaminado aos grupos controle e xarope contaminado aos grupos submetidos ao tratamento com as três concentrações estabelecidas. O peso dos alimentadores foi aferido para a determinação da DL<sub>50</sub>, sendo por 24 e 48 horas após a exposição aferida a quantidade de abelhas mortas, bem como comportamentos anormais.

Os experimentos constituíram em três replicatas por tratamento, cada uma composta por uma gaiola experimental com 10 abelhas, sendo validados quando apresentaram menos que 10% mortalidade nos grupos controles.

## **2.3. Determinação CL<sub>50</sub> e da DL<sub>50</sub> do tiametoxam em combinações binárias**

Os bioensaios realizados no presente trabalho seguiram os protocolos definidos por Nocelli et al. (2018) (submetido. Projeto CNPq 400540/2018), desenvolvido de acordo com os estabelecidos pela OCDE (1998a,1998b) em abelhas da espécie *A. mellifera*.

Após o período de adaptação em DBO em temperatura em  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $70 \pm 5\%$ , as abelhas das espécies *T. angustula* e *S. postica*, foram expostas oralmente aos agrotóxicos partir de alimentador constituído por um microtubo de polipropileno de 1,5 mL com furos ao lado. Foi oferecido xarope não contaminado aos grupos controle e xarope contaminado aos grupos submetidos aos cinco tratamentos com as combinações. O peso dos alimentadores foi aferido para a determinação da DL<sub>50</sub>, sendo por 24 e 48 horas após a exposição aferidas a quantidade de abelhas mortas e comportamentos anormais.

Os experimentos constituíram em três replicatas por tratamento, cada uma composta por uma gaiola experimental com 10 abelhas, sendo validados quando apresentaram menos que 10% mortalidade nos grupos controles.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do tipo dose-resposta obtidos nos bioensaios em 24 e 48 horas após a exposição foram analisados a partir da utilização de modelos lineares generalizados (GLM). Utilizando o ambiente estatístico R (R core team 2020), as funções de ligação logit, probit e os complementos log-log e cauchy foram testadas, sendo a função de ligação logit escolhida por melhor se ajustar aos dados de mortalidade.

Os dados obtidos referentes aos testes limites para o herbicida e para o fungicida não foram submetidos a análise estatística por não terem apresentado mortalidade durante a realização dos bioensaios.

Para o cálculo da  $DL_{50}$  em relação ao consumo (ng i.a./abelha), o consumo médio diário de alimento por abelha foi multiplicado pelo valor da  $CL_{50}$  encontrado na análise estatística. Já para a determinação da  $DL_{50}$  em relação ao peso (ng i.a./g abelha), o valor da  $DL_{50}$  achada em relação ao consumo foi dividido pela massa corporal em gramas de cada espécie, utilizando valores obtidos do trabalho realizado por Dorigo et al. (2018).

Possíveis interações toxicológicas foram identificadas utilizando os valores de toxicidade obtidos nas misturas binárias que não tiveram os intervalos de confiança (95%) sobrepostos aos dos dados achados por Lourencetti, Azevedo & Nocelli (em processo de submissão) para o inseticida de maneira isolada. Para tal, foi calculada a razão média estimada, em inglês Estimated Mean Ratio (EMR), que consiste na razão entre o endpoint de toxicidade isolado e o endpoint de toxicidade achado na mistura, sendo representado pela fórmula:  $EMR = EM_i/EM_{ij}$ , onde  $EM_i$  refere-se à toxicidade do agrotóxico isolado e  $EM_{ij}$  a toxicidade da mistura. Quando a razão entre a toxicidade isolada e a toxicidade combinada ultrapassa o valor de um, temos dois possíveis tipos de interação: antagônica ( $EMR < 1$ ) ou sinérgica ( $EMR > 1$ ) (CARNESECCHI et al., 2019; MORE et al., 2021; TOSI et al., 2022).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Teste limite

Tanto para o herbicida, quanto para o fungicida, os dados de mortalidade obtidos não foram diferentes dos dos grupos controles para que ocorresse a determinação da  $CL_{50}$  e da  $DL_{50}$  em relação ao consumo e peso das abelhas. Sendo o herbicida glifosato e o

fungicida tebuconazol, portanto, considerados não tóxicos (>100 µg i.a./abelha) para as abelhas *T. angustula* e *S. postica*.

#### 4.2. Bioensaios de toxicidade do tiametoxam em combinações binárias

A abelha da espécie *T. angustula* tem resultados de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub> para a combinação com o herbicida (GLI+TIA) de 0,603 ng i.a./µL, 1,56 ng i.a./ abelha e 382,58 ng i.a./g abelha em 24 horas, e 0,569 ng i.a./µL, 1,47 ng i.a./ abelha e 360 ng i.a./g de abelha em 48 horas (Tabela 1). Os dados de consumo do alimento contaminado obtidos para espécie durante o bioensaios foram de 2,6 µL por abelha, sendo o peso da mesma 4,1 x 10<sup>-3</sup> g (DORIGO et al., 2018).

Para a combinação com o fungicida (TEB+TIA) a espécie possui valores de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub> de 0,203 ng i.a./µL, 0,507 ng i.a./abelha e 123,780 ng i.a./g de abelha para 24 horas, e 0,1652 ng i.a./µL, 0,413 ng i.a./ abelha e 100,7 ng i.a./g de abelha em 48 horas (Tabela 1). Os dados de consumo do alimento contaminado obtidos para a espécie durante os bioensaios foram de 2,5 µL por abelha, sendo o peso da mesma de 4,1 x 10<sup>-3</sup> g (DORIGO et al., 2018).

| <i>T. angustula</i> | Tempo      | CL <sub>50</sub><br>(ng i.a./ µL) | DL <sub>50</sub><br>(ng i.a./abelha) | DL <sub>50</sub><br>(ng i.a./g de abelha) |
|---------------------|------------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| Glifosato<br>+      | 24         | 0,603<br>(0,72 – 0,771)           | 1,56<br>(0,447 – 1,64)               | 382,58<br>(109,02 – 413,7)                |
|                     | Tiametoxam | 0,569<br>(0,206 - 0,694)          | 1,479<br>(0,5356 – 1,448)            | 360,829,7<br>(130,634 – 353,219)          |
| Tebuconazol<br>+    | 24         | 0,203<br>(0,1846 – 0,223)         | 0,507<br>(0,461 – 0,557)             | 123,658<br>(112,43 – 135,85)              |
|                     | Tiametoxam | 0,1652<br>(0,135 – 0,170)         | 0,413<br>(0,337 – 0,425)             | 100,7<br>(82,3170 – 103,658)              |

**Tabela 1.** Toxicidade oral de misturas binárias contendo o tiametoxam e doses únicas do herbicida e do fungicida para a espécie *T.angustula* em 24 e 48 horas de exposição.

A abelha da espécie *S. postica* tem resultados de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub> para a combinação com o herbicida (GLI+TIA) de 1,489 ng i.a./μL, 14,980 ng i.a./abelha e 197,105 ng i.a./g abelha em 24 horas, e 0,296 ng i.a./μL, 2,960 ng i.a./ abelha e 41,11 ng i.a./g de abelha em 48 horas (Tabela 2). Os dados de consumo do alimento contaminado obtidos para espécie durante o bioensaios foram de 10 μL por abelha, sendo o peso da mesma 7,6 x 10<sup>-2</sup> g (DORIGO et al., 2018).

Para a combinação com o fungicida (TEB+TIA) a espécie possui valores de CL<sub>50</sub> e DL<sub>50</sub> de 0,089 ng i.a./μL, 0,712 ng i.a./abelha e 9,368 ng i.a./g de abelha para 24 horas, e 0,060 ng i.a./μL, 0,48 ng i.a./ abelha e 6,315 ng i.a./g de abelha em 48 horas (Tabela 2). Os dados de consumo do alimento contaminado obtidos para a espécie durante os bioensaios foram de 8 μL por abelha, sendo o peso da mesma de 7,6 x 10<sup>-2</sup> g (DORIGO et al., 2018).

| <i>S.postica</i> | Tempo | CL <sub>50</sub><br>(ng i.a./ μL) | DL <sub>50</sub><br>(ng i.a./abelha) | DL <sub>50</sub><br>(ng i.a./g de abelha) |
|------------------|-------|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| Glifosato<br>+   | 24    | 1,498<br>(0,560 – 13,026)         | 14,980<br>(5,600 – 130,026)          | 197,105<br>(73,684 – 1.710,868)           |
|                  | 48    | 0,296<br>(0,226 – 0,293)          | 2,960<br>(2,260 – 2,930)             | 41,11<br>(29,736 – 38,552)                |
| Tebuconazol<br>+ | 24    | 0,089<br>(0,078 – 0,101)          | 0,712<br>(0,348 – 0,808)             | 9,368<br>(8,210 – 10,631)                 |
|                  | 48    | 0,060<br>(0,048 – 0,069)          | 0,48<br>(0,384 – 0,552)              | 6,315<br>(5,052 – 7,2631)                 |

**Tabela 2.** Toxicidade oral de misturas binárias contendo o tiametoxam e doses únicas do herbicida e do fungicida para a espécie *S.postica* em 24 e 48 horas de exposição.

A toxicidade isolada do tiametoxam usada para identificar interações foi obtida do trabalho realizado por Lourencetti et al (em submissão). Nesse trabalho foi achado para a espécie *T.angustula* os valores de toxicidade de 0,329 (0,232 – 0,336) ng i.a./μL, 1,677 (1,183 – 1,713) i.a./abelha e 409,24 (288,536 – 417,951) ng i.a./g de abelha, e para *S. postica* os valores de 0,624 ng i.a./μL (0,192 – 1,2140), 5,553 (1,708- 10,804) ng i.a./abelha e 329,647 (100,470 – 635,529) ng i.a./g de abelha, em 24 horas de exposição.



Usando os dados dose letal mediana em relação ao consumo e a massa corporal em 24 horas produzidos no presente trabalho em que não ocorreram sobreposição em relação aos intervalos de confiança em 95%, calculamos os valores da razão média estimada (EMR) (CARNESECCHI et al., 2019; TOSI et al., 2022) para a combinação. Identificando assim interações de antagonismo e sinergismo em relação a toxicidade do tiametoxam.

Para a espécie *T. angustula* foi possível calcular a razão média estimada das duas combinações, sendo para a combinação com o herbicida em relação ao consumo e ao peso obtido, respectivamente, 1,11 e 1,07 (EMR = 1), caracterizando o efeito aditivo esperado da mistura. Em relação ao fungicida obtemos uma razão média estimada de 3,3 (EMR > 1) nas duas abordagens testadas, caracterizando uma interação sinérgica, ou seja, ocorreu o aumento significativo da toxicidade do inseticida tiametoxam quando ele foi ofertado para espécie em conjunto com o tebuconazol.

Para a espécie *S. postica* não foi possível calcular a razão média estimada das combinações com o glifosato devido a sobreposição dos intervalos de confiança em relação a toxicidade do inseticida isolado obtido no trabalho realizado por Lourencetti, Azevedo & Nocelli (em processo de submissão). Para o fungicida foram obtidas uma razão média estimada de 7,7 (EMR > 1) em relação ao consumo, e uma razão média estimada de 35,11 (EMR > 1) em relação ao consumo pela massa corporal, caracterizando nas duas abordagens uma relação sinérgica, ou seja, ocorreu um aumento significativo na toxicidade do inseticida tiametoxam quando ele foi ofertado para a espécie em conjunto com o tebuconazol.

## 5. DISCUSSÃO

Estabelecemos a variação da toxicidade oral do tiametoxam (Actara® WG 250) quando em combinação binária com doses de única concentração (100 µg/µL) do fungicida tebuconazol (Tebufort®) e do herbicida glifosato (Roundup Original® Mais) nas espécies de abelhas sem ferrão *T. angustula*, e *S. postica*, obtendo pela determinação da razão média estimada (EMR) as possíveis interações com o inseticida (CARNESECCHI et al., 2019; MORE et al., 2021; TOSÍ et al., 2022).

Realizando as transformações para os dados de 24 e 48 horas para a obtenção da DL<sub>50</sub> em relação ao consumo (ng i.a./ abelha) e em relação ao consumo pela massa

corporal (ng i.a./g de abelha), pudemos observar o mesmo padrão de sensibilidade entre as duas espécies de abelhas encontrado em Lourencetti, Azevedo & Nocelli (em submissão) e que em 48 horas ocorre um aumento na toxicidade, resultado esperado devido ao maior consumo de alimento pelas abelhas que sobreviveram após as 24 horas de exposição. Para os dois tipos de combinação, a abelha *T. angustula* demonstrou maior sensibilidade que a espécie *S. postica* quando apenas o consumo foi levado em consideração. Quando a relação consumo/massa corporal foi realizada o cenário inverteu-se, demonstrando maior sensibilidade da abelha *S. postica* em relação a *T. angustula*, sendo a que mais representou os dados de mortalidade obtidos nos bioensaios. As comparações realizadas reforçam a importância da inclusão de mais de uma espécie com tamanhos diferentes no processo de Avaliação de Risco Ambiental, uma vez que o metabolismo das abelhas e consequentes processos fisiológicos que envolvem a degradação de agrotóxicos no organismo podem estar relacionados a massa corporal (TAI et al., 2022; DUELL et al., 2022).

A razão média estimada (EMR) é uma das maneiras de representar a ocorrência de interações toxicológicas e apesar de menos acurado do que outras métricas como a razão de desvio do modelo (MDR), se encaixa bem em relação a dados onde um dos componentes das misturas não é considerado tóxico, como os achados no presente trabalho (CARNESECCHI et al., 2019; TOSI et al., 2022). Essas razões foram feitas para os dados de toxicidade das combinações em 24 horas utilizando os dados obtidos para o inseticida nas espécies de maneira isolada em Lourencetti, Azevedo e Nocelli (em submissão). Não foram encontradas interações nas combinações binárias contendo o tiametoxam e herbicida glifosato para as duas espécies, sendo possível a realização do EMR apenas para a espécie *T. angustula*, que foi igual a 1 nos dois cenários testados, demonstrando o efeito aditivo esperado para a combinação. Em relação a toxicidade do tiametoxam quando em combinação binária com o fungicida foram identificadas interações toxicológicas sinérgicas a para as duas espécies testadas em 24 horas após a exposição.

Os fungicidas Inibidores da Biossíntese de Ergosterol (EBI) classe à qual pertence o tebuconazol, interferem na capacidade de desintoxicação de enzimas da superfamília citocromo P450 monooxigenase presentes no organismo das abelhas, afetando a degradação de inseticidas neonicotinoides, o que leva ao aumento da toxicidade (TOSI et al., 2022). As informações, aqui apresentadas vão de acordo com trabalhos que

demonstram relações de sinergia onde essa classe de fungicidas são misturados em combinações binárias e ternárias de neonicotinoides e outros inseticidas (SGOLASTRA et al., 2016; RAIMETS et al., 2018; GLAVAN; BOŽIČ; 2019; TOSI; NIEH, 2019; BRIGANTE et al., 2021; BELDEN, 2022).

As interações de sinergia causadas por fungicidas Inibidores da Biossíntese de Ergosterol (EBI) com neonicotinoides demonstram ser intensificadas com o aumento da concentração do mesmo, como demonstrado por Willow et al. (2019) com vespas parasitoides em relação ao tebuconazol. Em geral, interações de sinergismo podem ser dose-dependentes e aumentam com o aumento da concentração do agrotóxico causador do efeito na combinação (AZPIAZU et al., 2021). O que vai no sentido contrário aos resultados achados por Pal et al. (2022) em relação a sobrevivência de abelhas da espécie *A. mellifera*, onde as doses intermediárias entre 0.01, 0.1 µg/L causaram maior mortalidade em combinações binárias e ternárias entre o inseticidaneonicotinóide imidacloprido, o herbicida glifosato e o fungicida difeconazol. O presente trabalho utilizou uma concentração de 100 µg i.a./µL em dose única do herbicida e do fungicida em combinação com cada concentração do inseticida, sendo essa a maior das utilizadas nos testes limites. Não obtivemos dados em relação a combinações com as concentrações de 1 e 10 µg i.a./µL, mais coerentes com as condições de campo e que por possuírem menor concentração podem causar efeitos sinérgicos de menor intensidade em relação aos aqui observados para o tiametoxam com o fungicida tebuconazol.

A realização dos testes limites demonstrou que esses agrotóxicos são considerados não tóxicos para as espécies de abelhas sem ferrão quando testadas de maneira isolada, apresentando toxicidade maior que 100 µg i.a./abelha (USEPA, 2017). Vale ressaltar que apesar de serem considerados não tóxicos a exposição de abelhas a esses agrotóxicos de maneira isolada causa um variado leque de efeitos subletais (IWASAK; HOGENDOORN, 2021; STRAW; BROWN, 2021; STRAW et al., 2022), além de interferirem nas relações ecológicas estabelecidas por esses polinizadores, levando ao conseqüente enfraquecimento das colônias (MAIN et al., 2020, TOSI et al., 2022).

Os herbicidas afetam diretamente a disponibilidade de alimento das abelhas por serem usados para eliminar plantas espontâneas que geralmente disponibilizam recursos como néctar e pólen a esses e outros polinizadores animais em paisagens agrícolas (BELSKY; JOSHI, 2020; WARD et al., 2022). Além de também afetarem a sobrevivência de

abelhas sem ferrão, como obtido com a espécie *Melipona scutellaris* com combinações de doses de campo dos herbicidas 2,4-D e glifosato no trabalho realizado por Nocelli, Soares & Monquero (2019). O glifosato, herbicida estudado no presente trabalho, é amplamente utilizado ao redor do mundo e no Brasil (BALBUENA et al., 2015; CRISTOFARO et al., 2021), sendo as abelhas silvestres e manejadas presentes nos biomas brasileiros expostas a altas concentrações de produtos formulados que o possuem como ingrediente ativo. Estudos em relação aos efeitos subletais mostram que a exposição a doses do herbicida afeta o aprendizado, consumo de alimento, voo, microrganismos presentes no intestino e até mesmo a qualidade e frequência do sono de abelhas da espécie *A. mellifera* (DAI et al., 2018; MOTTA et al., 2020; VÁZQUEZ et al., 2020).

Abelhas expostas a fungicidas contendo como ingrediente ativo a piraclostrobina e a azoxistrobina – estrobirulinas foliares – comprometeram a alimentação de abelhas da espécie e afetaram o microbioma do intestino de abelhas da espécie *A. mellifera* (DEGRANDI – HOFFMAN et al., 2015; AL NAGGAR et al., 2022). O fungicida piraclostrobina afetou morfofisiologicamente o intestino de abelhas sem ferrão da espécie *Melipona scutellaris* e levou a diminuição na sobrevivência (DA COSTA DOMINGUES et al., 2020), enquanto o fungicida triazol difeconazol diminuiu a sobrevivência da abelha sem ferrão *T. angustula* (LEITE et al., 2021). De forma geral, fungicidas levam ao comprometimento do sistema imune e dos processos de desintoxicação das mesmas, além de diminuir de maneira significativa a sobrevivência de indivíduos testados (FISHER et al., 2017; DA COSTA DOMINGUES et al., 2020).

Além da questão acerca dos efeitos no organismo das abelhas, o uso intensivo de fungicidas interage com microrganismos benéficos e patogênicos. A alta exposição a fungicidas é apontado como determinante para o aumento de infecções pelo microsporídio *Nosema bombi* e consequente diminuição nas populações espécies do gênero *Bombus* nos Estados Unidos (MCART et al., 2017; SIVITER et al., 2020). O mesmo padrão pode ser encontrado para *A. mellifera* em relação a *Nosema ceranae* (TADEI; MENEZES-OLIVEIRA; SILVA-ZACARIN, 2020), uma vez que a probabilidade de infecções é maior em abelhas que consomem pólen contaminado, como destacado por Pettis et al. (2013). Quando pensamos nas abelhas sem ferrão, temos que suas larvas dependem de fungos para completarem o crescimento devido à ausência interna de hormônios esteróis relacionados a esse processo (PALUDO et al., 2018; DE PAULA, 2021), resíduos de fungicidas levados

para dentro de colmeias podem prejudicar esses microrganismos simbiotes, causando mortalidade das crias e diminuição do número de indivíduos adultos ao longo do tempo (CULLEN et al., 2019). Porém pouco se sabe sobre esses microrganismos e os efeitos dos fungicidas em relação as abelhas sem ferrão.

O presente trabalho, assim como outros que analisaram o efeito de combinações de agrotóxicos em abelhas sem ferrão (TOMÉ et al., 2017; DO PRADO et al., 2020; ALMEIDA et al., 2021; BRIGANTE et al., 2021), ressalta a extrema susceptibilidade desses polinizadores a interações toxicológicas de sinergia quando saem em busca de recursos ou estão em seus ambientes naturais no Brasil. A prática de misturar agrotóxicos em tanque antes da aplicação, uso de produtos formulados com ingredientes ativos de diferentes classes, bem como a aplicação sucessiva de agrotóxicos por agricultores no país é comum e não é avaliada por nenhum dos órgãos responsáveis pelas avaliações dos riscos causados por esses xenobióticos (GAZZIERO, 2015; GAZZIERO et al., 2021; FRIEDRICH et al., 2022).

Uma alternativa interessante a ser realizada em curto prazo é a identificação de possíveis interações entre fungicidas, herbicidas e inseticidas e a criação de um score para orientação dos agricultores em relação aos efeitos em organismos não alvo como abelhas, como o proposto para herbicidas no trabalho realizado por Cardoso, Santos & Araújo (2021) onde apresentou uma plataforma que unifica informações a respeito da compatibilidade de produtos em misturas de tanque, sendo fornecidas informações sobre 224 combinações. O que colabora também para diminuição de riscos ocupacionais, uma vez que essas interações são identificadas em mamíferos e podem afetar a saúde humana (PAUMGARTTEN et al., 2021; FRIEDRICH et al., 2022).

A longo prazo, são necessários o desenvolvimento de estudos e protocolos que possibilitem a inserção da questão das misturas no processo de Avaliação de Risco Ambiental para a espécie *A. mellifera* e representantes de abelhas sem ferrão, uma vez que produtos formulados contendo mais de um ingrediente ativo são comercializados e que essas abelhas nativas são consideradas mais susceptíveis (SALES et al., 2022, TOSI et al., 2022).

## **6. CONCLUSÃO**

Nossos resultados demonstram interações toxicológicas de sinergismo para as duas espécies testadas quando o inseticida neonicotinóide tiametoxam foi ofertado em combinação binária com o fungicida EBI tebuconazol trazendo evidências científicas sobre o potencial que esses fungicidas possuem de interferir nos mecanismos de desintoxicação de inseticidas no organismo de espécies representantes do grupo das abelhas sem ferrão na Avaliação de Risco Ambiental.

Ressaltamos que há a necessidade de desenvolver estudos com doses intermediárias as aqui utilizadas para o herbicida e o fungicida, avaliando assim cenários mais realistas em relação as condições de campo e intensidade da interação.

Colaboramos com o conhecimento acerca da relevância do peso corporal para as diferentes sensibilidades encontradas para o tiametoxam nas espécies de abelhas sem ferrão *T. angustula* e *S. postica*, sendo esse um fator a ser considerado por estudos que realizam a determinação de doses letais em abelhas. Além de ressaltar a maior sensibilidade das espécies em relação ao modelo biológico usado no atual processo de Avaliação de Risco Ambiental.

O presente trabalho suporta as hipóteses de que combinações contendo agrotóxicos considerados relativamente seguros para esses polinizadores, como fungicidas, potencializam o efeito de agrotóxicos altamente tóxicos para abelhas, e que o atual processo de Avaliação de Risco Ambiental brasileiro não é protetivo a abelhas sem ferrão por não avaliar tais condições e utilizar abelhas da espécie *A. mellifera* como modelo biológico.

Elucidamos que medidas a curto e longo prazo são necessárias para mitigar os impactos de misturas de agrotóxicos nesses polinizadores e em outros organismos não alvo, uma vez que não há regulamentação sobre o assunto.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AL NAGGAR, Y. et al. Bees under interactive stressors: The novel insecticides flupyradifurone and sulfoxaflor along with the fungicide azoxystrobin disrupt the gut microbiota of honey bees and increase opportunistic bacterial pathogens. **Science of The Total Environment**, v. 849, p. 157941, 2022.

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. 111013, 2020.

ALMEIDA, C. H. S et al. Sublethal agrochemical exposures can alter honey bees' and Neotropical stingless bees' color preferences, respiration rates, and locomotory responses. **Science of the Total Environment**, v. 779, p. 146432, 2021.

AZPIAZU, C. et al. Toxicity of the insecticide sulfoxaflor alone and in combination with the fungicide fluxapyroxad in three bee species. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

BALBUENA, M. S. et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **The Journal of experimental biology**, v. 218, n. 17, p. 2799-2805, 2015.

BELDEN, J. B. The acute toxicity of pesticide mixtures to honeybees. **Integrated Environmental Assessment and Management**, 2022.

BELSKY, Joseph; JOSHI, Neelendra K. Effects of fungicide and herbicide chemical exposure on *Apis* and non-*Apis* bees in agricultural landscape. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, p. 81, 2020.

BÖHME, F. et al. Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. **Apidologie**, v. 48, n. 3, p. 353-363, 2017.

BRIGANTE, J. et al. Acute toxicity of the insecticide abamectin and the fungicide difenoconazole (individually and in mixture) to the tropical stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology**, v. 30, n. 9, p. 1872-1879, 2021

CARDOSO, C. H. M. et al. MistuRe: Uma Plataforma para Unificação de Dados Científicos sobre Compatibilidade de Produtos em Misturas de Tanque com Calda Herbicida. In: **Anais Estendidos do XVII Simpósio Brasileiro de Sistemas de Informação**. SBC, 2021. p. 181-184.

CARNESECCHI, E. et al. Investigating combined toxicity of binary mixtures in bees: Meta-analysis of laboratory tests, modelling, mechanistic basis and implications for risk assessment. **Environment International**, v. 133, p. 105256, 2019.

CHAM, K. O. et al. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 36-48, 2019.

CRISTOFARO, C. S. et al. Assessing glyphosate concentrations in six reservoirs of Paraíba do Sul and Guandu River Basins in southeast Brazil. **Revista Ambiente & Água**, v. 16, 2021.

CULLEN, M. G. et al. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. e0225743, 2019.

DA COSTA DOMINGUES, Caio Eduardo et al. Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111395, 2020.

DAI, P. et al. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 29, p. 7786-7793, 2018.

DAINESE, M. et al. A global synthesis reveals biodiversity-mediated benefits for crop production. **Science advances**, v. 5, n. 10, p. eaax0121, 2019.

DE PAULA, G. T. et al. Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 41-47, 2021.

DEGRANDI-HOFFMAN, G. et al. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of economic entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518-2528, 2015.

DÍAZ, S. et al. The IPBES Conceptual Framework—connecting nature and people. **Current opinion in environmental sustainability**, v. 14, p. 1-16, 2015.

DO 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, p. 114313, 2020.

DOS SANTOS ARAÚJO, R.; BERNARDES, R. C.; MARTINS, G. F. A mixture containing the herbicides Mesotrione and Atrazine imposes toxicological risks on workers of *Partamona helleri*. **Science of the Total Environment**, v. 763, p. 142980, 2021.

DUELL, M. E. et al. Size –Dependent scaling of stingless bee flight metabolism reveals an energetic benefit to small body size. **Integrative and Comparative Biology**. 2022.

ELLIS, R. A. et al. From a free gift of nature to a precarious commodity: Bees, pollination services, and industrial agriculture. **Journal of Agrarian Change**, v. 20, n. 3, p. 437-459, 2020.

FERNANDES, C.L. F. et al. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 2, p. 256-270, 2020.



FISHER, A. et al. The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (Hymenoptera: Apidae) forager survival. **Journal of economic entomology**, v. 110, n. 3, p. 802-808, 2017.

FRIEDRICH, K. et al. Toxicologia crítica aplicada aos agrotóxicos—perspectivas em defesa da vida. **Saúde em Debate**, v. 46, p. 293-315, 2022.

FRIEDRICH, K. et al. Toxicologia crítica aplicada aos agrotóxicos—perspectivas em defesa da vida. **Saúde em Debate**, v. 46, p. 293-315, 2022.

GAZZIERO, D. L. P. et al. Manual técnico para subsidiar a mistura em tanque de agrotóxicos e afins. **Embrapa Soja-Docmentos (INFOTECA-E)**, 2021.

GAZZIERO, D. L. P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha**, v. 33, p. 83-92, 2015.

GILL, R.J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E. Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 105-108, 2012.

GLAVAN, G. BOŽIČ, J. The synergy of xenobiotics in honeybee *Apis mellifera*: Mechanisms and effects. **Acta Biologica Slovenica**, v.56, 2013.

GONZALEZ, V. H. et al. Nesting ecology and the cultural importance of stingless bees to speakers of Yoloxóchitl Mixtec, an endangered language in Guerrero, Mexico. **Apidologie**, v. 49, n. 5, p. 625-636, 2018.

GOULSON, D. Pesticides, corporate Irresponsibility, and the fate of our Planet. **One Earth**, v. 2, n. 4, p. 302-305, 2020.

HAN, W. et al. Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 4, p. 399-411, 2019.

HERNÁNDEZ, A. F.; GIL, F.; LACASANA M. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. **Arch Toxicol**, v.91, p.3211-3223, 2017.

IPBES (2019): **Global assessment report on biodiversity and ecosystem services of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**. E. S. Brondizio, J. Settele, S. Díaz, and H. T. Ngo (editors). IPBES secretariat, Bonn, Germany. 1148 pages.

IWASAKI, J. M.; HOGENDOORN, Katja. How protection of honey bees can help and hinder bee conservation. **Current Opinion in Insect Science**, v. 46, p. 112-118, 2021.

KLEIN A. M. et al. **Insect Pollination of Crops in Brazil: A Guide for Farmers, Gardeners, Politicians and Conservationists**. 1<sup>a</sup> ed. p. 149. 2020

LEITE, D. T. et al. Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, n. 1, p. 435-443, 2022.

LOPES, A.V. et al. Neglected diversity of crop pollinators: Lessons from the world's largest tropical country. **Perspectives in Ecology and Conservation**, v. 19, n. 4, p. 500-504, 2021.

MCART, S. H. et al. Landscape predictors of pathogen prevalence and range contractions in US bumblebees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1867, p. 20172181, 2017.

MORE, S. J. et al. EFSA is working to protect bees and shape the future of environmental risk assessment. **EFSA Journal**, v. 19, n. 1, p. e190101, 2021.

MOTTA, E. VS et al. Oral or topical exposure to glyphosate in herbicide formulation impacts the gut microbiota and survival rates of honey bees. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 18, p. e01150-20, 2020.

NOCELLI, R. C. F.; SOARES, S. M. M.; MONQUERO, P. A. Effects of herbicides on the survival of the Brazilian native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

PAL, E. et al. Toxicity of the Pesticides Imidacloprid, Difenoconazole and Glyphosate Alone and in Binary and Ternary Mixtures to Winter Honey Bees: Effects on Survival and Antioxidative Defenses. **Toxics**, v. 10, n. 3, p. 104, 2022.

PALUDO, C. R. et al. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

PAUMGARTTEN, F. J. R. On the health risks of "hidden poisons on our table", good agricultural practices, pesticide residues in food, and dietary exposure assessments. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, 2021.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

PISA, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 68-102, 2015.

POTTS, S.G. et al. Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220-229, 2016.

PRADO, A. et al. Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 1250-1260, 2019.

QUEZADA-EUÁN, J. J. G. et al. The economic and cultural values of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 534-557, 2018.

RAIMETS, R. et al. Synergistic interactions between a variety of insecticides and an ergosterol biosynthesis inhibitor fungicide in dietary exposures of bumble bees (*Bombus terrestris* L.). **Pest management science**, v. 74, n. 3, p. 541-546, 2018.

RORTAIS, A. et al. Risk assessment of pesticides and other stressors in bees: principles, data gaps and perspectives from the European Food Safety Authority. **Science of the total environment**, v. 587, p. 524-537, 2017.

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

SALES, V. R. et al. A systematic review of research conducted by pioneer groups in ecotoxicological studies with bees in Brazil: advances and perspectives. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-22, 2022.

SGOLASTRA, F. et al. Combined exposure to sublethal concentrations of an insecticide and a fungicide affect feeding, ovary development and longevity in a solitary bee. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 285, n. 1885, p. 20180887, 2018.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A.R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, edição 1, 253 p, 2002.

SPONSLER, B. et al. Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis. **Science of the Total Environment**, v. 662, p. 1012-1027, 2019.

STRAW, E. A.; BROWN, M. J.F. Co-formulant in a commercial fungicide product causes lethal and sub-lethal effects in bumble bees. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2021.

STRAW, Edward A.; CARPENTIER, Edward N.; BROWN, Mark JF. Roundup causes high levels of mortality following contact exposure in bumble bees. **Journal of Applied Ecology**, v. 58, n. 6, p. 1167-1176, 2021.

TADEI, R.; MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized Apis

mellifera and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115622, 2020.

TOMÉ, H.V. et al. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. **R. Soc. Open Sci.** v.4, n.1, 2017.

TOPPING, C. J.; ALDRICH, A.; BERNY, P. Overhaul environmental risk assessment for pesticides. **Science**, v. 367, n. 6476, p. 360-363, 2020.

TOSI, S.; NIEH, J. C. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 286, n. 1900, p. 20190433, 2019.

USEPA. Technical Overview of Ecological Risk Assessment – Analysis Phase: Ecological Effects Characterization, 2017, Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>.

Acessado em 12 de set 2022.

VAN DER SLUIJS, J.P. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*. v. 5, p. 293-305, 2013.

VÁZQUEZ, D. E. et al. Sleep in honey bees is affected by the herbicide glyphosate. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.

VIANA-SILVA, F. et al. Selection matrix for Brazilian bee species to risk assessment of pesticides. **Julius –Kühn –Archiv**, 462, 56-61, 2018.

VIANA-SILVA, F. et al. Selection matrix for Brazilian bee species to risk assessment of pesticides. **Julius-Kühn-Archiv**, v.462, p. 56-61,2018.

VIECELLI, M. et al. Response of wheat plants to combinations of herbicides with insecticides and fungicides. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

WANG, Y.; ZHU, Y. C.; LI, W. Interaction patterns and combined toxic effects of acetamiprid in combination with seven pesticides on honey bee (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 190, p. 110100, 2020.

WARD, L. T. et al. Pesticide exposure of wild bees and honey bees foraging from field border flowers in intensively managed agriculture areas. *Science of The Total Environment*, v. 831, p. 154697, 2022.

WEISNER, O. et al. Risk from pesticide mixtures–The gap between risk assessment and reality. **Science of The Total Environment**, v. 796, p. 149017, 2021.

WILLOW, J. et al. Acute effect of low-dose thiacloprid exposure synergised by tebuconazole in a parasitoid wasp. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0212456, 2019.

ZALLER, J. G.; BRÜHL, C. A. Non-target effects of pesticides on organisms inhabiting agroecosystems. **Frontiers in Environmental Science**, v. 7, p. 75, 2019.

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho teve como objetivo analisar se os protocolos de avaliação de risco de agrotóxicos para abelhas definidos pela OCDE e adotados pelo Brasil são protetivos para o grupo das abelhas sem ferrão.

Para tal escolhemos avaliar a toxicidade oral do inseticida neonicotinóide tiametoxam, a partir do produto comercial Actara® 250 WG isolado e em combinações binárias com o herbicida glifosato, a partir do produto comercial Roundup Original®, e com o fungicida tebuconazol, a partir do produto comercial Tebufort® em espécies elencadas como possíveis modelos para os testes ecotoxicológicos presentes no processo regulatório: *T. angustula*, *S. postica* e *M. scutellaris*, polinizadores de grande relevância em cultivos agrícolas, com ampla distribuição geográfica e colônias populosas com manejo bem conhecido. Ressaltamos que utilizamos testes de toxicidade oral baseados nos definidos pela OCDE, que junto ao teste de toxicidade tópica passa pelo processo de Ring test que ocorre atualmente em universidades e empresas do país, proporcionando assim possível validação internacional aos protocolos com sua finalização.

Ao desenvolver os testes com as espécies de abelhas sem ferrão respondemos as hipóteses levantadas inicialmente no desenvolvimento desse projeto, as quais estão divididas em dois capítulos em formato de artigo científico. O primeiro deles intitulado “Abelhas sem ferrão e a Avaliação de Risco Ambiental: dados toxicológicos de três espécies de abelhas sem ferrão.”, e o segundo “Interações entre agrotóxicos alteram a toxicidade do neonicotinóide tiametoxam em abelhas sem ferrão”.

O primeiro capítulo respondeu hipóteses relacionadas a toxicidade isolada do inseticida neonicotinóide tiametoxam comparando a sensibilidade das espécies de abelhas sem ferrão aos dados disponíveis na literatura para *A. mellifera*. Em relação ao mesmo, foi possível inferir que de maneira isolada para as espécies *T. angustula*, *S. postica* e *M. scutellaris* o inseticida tiametoxam é altamente tóxico, sendo o tamanho corporal um fator essencial para avaliar a sensibilidade encontrada entre os representantes desse grupo de

abelhas, e que o atual modelo biológico não é protetivo para nenhuma das espécies quando o fator de segurança em relação a espécie modelo é aplicado para os dados de toxicidade que levaram em consideração a massa corporal das abelhas. Das espécies, a abelha *M. scutellaris* - maior tamanho entre as espécies testadas - apresentou a maior susceptibilidade.

Já o segundo capítulo respondeu hipóteses voltadas a possíveis interações entre um herbicida e um fungicida em relação a toxicidade do tiametoxam a partir de misturas binárias. Nesse, foi identificado o mesmo padrão de sensibilidade para as espécies *T. angustula* e *S. postica* encontradas no primeiro capítulo, reforçando os dados e observações tidas em relação a massa corporal e variação de tamanhos entre as espécies de abelhas sem ferrão. Para ambas as espécies, efeitos aditivos foram achados para as combinações com o herbicida, sendo para o fungicida identificado efeito sinérgicos, esperados devido a característica de influenciar nas vias metabólicas de desintoxicação de xenobióticos encontrada nos triazóis.

Concluimos com as informações aqui levantadas que o atual processo regulatório superestima os efeitos letais de inseticidas como os neonicotinoides em abelhas sem ferrão, quando utilizado apenas a espécie modelo *A. mellifera* e ingredientes ativos isolados nos testes ecotoxicológicos exigidos na primeira etapa do processo, impedindo assim avaliação do cenário onde populações de espécies de abelhas sem ferrão são expostas a uma gama ingredientes ativos e adjuvantes que são amplamente utilizados na agricultura brasileira.

Apontamos a necessidade de desenvolvimento e financiamento de projetos que realizem estudos como o aqui apresentado, visando dar respaldo para inclusão de espécies modelos representantes desse grupo de abelhas, e para regulamentação e recomendações técnicas em relação a combinações entre agrotóxicos e efeitos deletérios em organismos não-alvo como abelhas e outros polinizadores.