

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

**JOYCE BOVO**

**DESENVOLVIMENTO DE *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 EXPOSTA A  
CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE AGROTÓXICOS COM FOCO NOS ÓRGÃOS  
SENSORIAIS**

**ARARAS**

**2023**

**JOYCE BOVO**

**DESENVOLVIMENTO DE *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 EXPOSTA A  
CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS DE AGROTÓXICOS COM FOCO NOS ÓRGÃOS  
SENSORIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

Orientação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roberta Cornélio  
Ferreira Nocelli

**ARARAS**

**2023**

Bovo, Joyce

Desenvolvimento de *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 exposta a concentrações subletais de agrotóxicos com foco nos órgãos sensoriais / Joyce Bovo -- 2023. 44f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Banca Examinadora: Annelise de Souza Rosa-Fontana, Ricardo Toshio Fujihara

Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. Abelhas-sem-ferrão. 3. Agrotóxicos.  
I. Bovo, Joyce. 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 Joyce Bovo, realizada em 14/09/2023.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (UFSCar)

Prof. Dr. Annelise Rosa Fontana (UNESP)

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara (UFSCar)

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

*Dedico este trabalho a todos os professores que passaram pela minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço às pessoas queridas que sempre acreditaram que eu seria capaz e me incentivaram a seguir em frente.

Aos meus pais Ivani e Márcio, por todos os esforços para contribuir com a minha educação. Minha irmã Laís, por me incentivar e me ter como um espelho, quando me ensina tanto. E Matheus, por todo o apoio e serenidade nas palavras, que me acalmaram nos momentos mais desafiadores.

Aos colegas do grupo de pesquisa Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAs), especialmente ao Caio, Camila, Cliver, Gabrielle, Guilherme, Jaqueline e Laís, que contribuíram com meus experimentos. Também agradeço a Ana Paula pela grande ajuda com a escrita, pelos conselhos e parceria desde a graduação.

Aos pesquisadores que contribuíram de alguma forma com minha pesquisa, seja por meio de treinamentos e bancas de avaliação, como também pelas conversas e sugestões, que tanto me ajudaram no desenvolvimento dos experimentos.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, que foi minha professora desde a graduação, e aceitou prontamente a me orientar nessa etapa tão importante da minha carreira acadêmica.

Ao programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, especialmente aos professores que contribuíram diretamente para minha formação, mas também aos servidores que nos auxiliam em todos os momentos. Também agradeço aos meus colegas de turma.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela bolsa concedida (Processo 2022/08799-7) e pelos projetos aprovados (2017/21097-3) e financiados para a produção de conhecimento relacionado às abelhas-sem-ferrão.

## RESUMO

As abelhas são os principais polinizadores de plantas nativas e culturas economicamente importantes. Com o uso indiscriminado de agrotóxicos no Brasil, estudos relacionados aos efeitos destes produtos sobre essas espécies são necessários. Atualmente os testes de avaliação de risco são baseados em uma espécie exótica, mas existem lacunas de conhecimento sobre utilizá-la para representar espécies nativas, como as abelhas-sem-ferrão. Para contribuir com o conhecimento acerca dessas espécies, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a exposição a concentrações subletais do inseticida tiametoxam e do fungicida piraclostrobina, isolados e combinados, afeta o desenvolvimento pós-embriônico e a formação de estruturas que compõem órgãos dos sistemas olfativo e visual da espécie *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). Para isso, larvas foram expostas aos seguintes tratamentos: CTL (Controle negativo), ACE (Controle solvente - acetona), DIM (Controle positivo - dimetoato), TMX (Tiametoxam), PIR (Piraclostrobina) e TMX+PIR (Combinação). As concentrações utilizadas foram 0,044 ng i.a./larva de tiametoxam e 69,675 ng i.a./larva de piraclostrobina. O desenvolvimento pós-embriônico foi avaliado por meio das taxas de mortalidade, pupação, emergência das larvas e das pupas. Além disso, foram realizadas análises morfológicas e morfométricas para avaliar as antenas e olhos por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os tipos de sensilas presentes nas antenas foram identificados e quantificados, e a diagonal das facetas oculares foram medidas. Os resultados demonstraram que o tiametoxam promoveu adiantamento na fase de pupa de olhos brancos. A combinação entre o tiametoxam e piraclostrobina interferiu na emergência das pupas e promoveu atraso das fases de pupa de olhos rosas e pupa de olhos marrons. Na emergência, foi observado atraso dos grupos expostos ao piraclostrobina e a combinação. Em relação às estruturas sensoriais, o tiametoxam interferiu na formação das sensilas celocônicas e ampuláceas, mas o mesmo não foi observado para o piraclostrobina e para a combinação. Para os demais tipos de sensilas e facetas oculares, não foram observadas alterações nos grupos expostos. Concluiu-se que a exposição a concentrações subletais do tiametoxam e piraclostrobina, isolados e combinados, afetou a emergência e os tempos de desenvolvimento das pupas de *S. postica*, mas apenas o tiametoxam interferiu na formação das sensilas.

**Palavras-chave:** Declínio de abelhas-sem-ferrão, piraclostrobina, tiametoxam, olhos compostos, sensilas antenais.

## ABSTRACT

Bees are primary pollinators of native plants and economically important crops. With the indiscriminate use of pesticides in Brazil, studies related to the effects of these products on these species are necessary. Nowadays, risk assessment tests use an exotic species, but there are knowledge gaps regarding its use to represent native species, such as stingless bees. To contribute to the knowledge about these species, this work aimed to evaluate if the exposure to sublethal concentrations of the insecticide thiamethoxam and the fungicide pyraclostrobin, both individually and mixed, affects the post-embryonic development and structures development of the olfactory and visual systems of the species *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). For this purpose, we exposed larvae to the following treatments: CTL (Negative control), ACE (Solvent control - acetone), DIM (Positive control - dimethoate), TMX (Thiamethoxam), PYR (Pyraclostrobin), and TMX+PYR (Mixture). The concentrations used were 0.044 ng a.i./larva of thiamethoxam and 69.675 ng a.i./larva of pyraclostrobin. We evaluated post-embryonic development through mortality rates, pupation, larval emergence, and pupal emergence rates. In addition, we evaluated the antennae and eyes through morphological and morphometric analyses using scanning electron microscopy (SEM). We identified and quantified the types of sensilla present on the antennae, and measured the ocular facets diagonal. The results indicated that thiamethoxam advanced the pupal stage of white-eyed individuals. The mixture of thiamethoxam and pyraclostrobin interfered with pupal emergence and caused delays in the pink-eyed and brown-eyed pupal stages. In the groups exposed to pyraclostrobin and the mixture of the pesticides, we observed a delay of emergence. About sensory structures, thiamethoxam interfered with the coeloconic and ampullaceous sensilla development, but the same did not happen for pyraclostrobin and the mixed groups. No changes were observed in the exposed groups for the other types of sensilla and ocular facets. Our study concluded that exposure to sublethal concentrations of thiamethoxam and pyraclostrobin, individually and mixed, affected the pupal development times and emergence of *S. postica*. However, only thiamethoxam interfered with the development of sensilla.

**Keyword:** Decline of stingless bees, pyraclostrobin, thiamethoxam, compound eyes, antennal sensilla.

## LISTA DE FIGURAS

<b>ARTIGO 1. Concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina interferem no desenvolvimento pupal de <i>Scaptotrigona postica</i>.....</b>	<b>6</b>
Figura 1. Coleta dos discos de cria.....	10
Figura 2. Preenchimento e armazenamento das placas acrílicas.....	13
Figura 3. Estágios de desenvolvimento larval de <i>S. postica</i> .....	14
Figura 4. Estágios de desenvolvimento pupal de <i>S. postica</i> .....	15
Figura 5. Tempo em que os indivíduos de <i>S. postica</i> atingiram o 5º instar.....	18
Figura 6. Tempo em que os indivíduos de <i>S. postica</i> defecaram.....	18
Figura 7. Tempo em que os indivíduos de <i>S. postica</i> atingiram pupa de olhos brancos.....	19
Figura 8. Tempo em que os indivíduos de <i>S. postica</i> atingiram pupa de olhos rosas.....	19
Figura 9. Tempo em que os indivíduos de <i>S. postica</i> atingiram pupa de olhos marrons.....	20
Figura 10. Tempo em que os indivíduos de <i>S. postica</i> atingiram pupa de olhos pretos.....	20
Figura 11. Tempo em que os indivíduos de <i>S. postica</i> emergiram.....	21
<b>ARTIGO 2. Efeitos da exposição ao tiametoxam e piraclostrobina na formação de estruturas sensoriais importantes para o forrageamento de <i>Scaptotrigona postica</i>.....</b>	<b>28</b>
Figura 1. Preparo de <i>S. postica</i> para MEV.....	33
Figura 2. Micrografia eletrônica de varredura da antena de <i>S. postica</i> .....	34
Figura 3. Micrografias eletrônicas de varredura dos olhos de <i>S. postica</i> .....	35
Figura 4. Diferentes tipos de sensilas presentes nas antenas de <i>S. postica</i> .....	36

## LISTA DE TABELAS

**ARTIGO 1. Concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina interferem no desenvolvimento pupal de *Scaptotrigona postica*.....6**

Tabela 1. Mortalidade, pupação e emergência de *S. postica*..... 16

**ARTIGO 2. Efeitos da exposição ao tiametoxam e piraclostrobina na formação de estruturas sensoriais importantes para o forrageamento de *Scaptotrigona postica*.....28**

Tabela 1. Quantidade de sensilas encontradas nas antenas de *S. postica*.....37

Tabela 2. Comprimento da diagonal das facetas de *S. postica*.....37

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{m}$  – Micrômetro

ACE – Controle solvente

ASAs – Abelhas e os Serviços Ambientais

B.O.D. – Demanda Bioquímica de Oxigênio

BPBES – Plataforma Brasileira de Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos

CA – Sensilas celocônicas/ampuláceas

CE – Sensilas cétricas

$\text{CO}_2$  – Dióxido de carbono

CTL – Controle negativo

DIM – Controle positivo

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

GLM – Modelos Lineares Generalizados

i.a. – Ingrediente ativo

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IPCC – Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

ng – Nanogramas

$\text{O}_2$  – Oxigênio

$^{\circ}\text{C}$  – Grau *Celsius*

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PIR – Piraclostrobina

SB – Sensilas basicônicas

SP – Sensilas placoides

ST – Sensilas tricoides

TL – Temperatura letal

TMX – Tiametoxam

TMX+PIR – Combinação

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

UV – Ultravioleta

## 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. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>4</b>
<b>ARTIGO 1 Concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina interferem no desenvolvimento pupal de <i>Scaptotrigona postica</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 Delineamento experimental .....	10
2.1.1 Coleta do material biológico .....	10
2.1.2 Concentrações obtidas dos agrotóxicos .....	11
2.1.3 Bioensaios de exposição .....	11
<b>3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>13</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>14</b>
4.1 Taxas de pupação, emergência e mortalidade .....	14
4.2 Tempo em cada fase de desenvolvimento .....	17
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>24</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>24</b>
<b>ARTIGO 2 Efeitos da exposição ao tiametoxam e piraclostrobina na formação de estruturas sensoriais importantes para o forrageamento de <i>Scaptotrigona postica</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
2.1 Delineamento experimental .....	32

2.1.1	Preparo do material biológico para MEV .....	32
2.1.2	Análise da superfície das antenas.....	33
2.1.3	Análise da superfície dos olhos.....	34
<b>3.</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>35</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
4.1	Morfologia e sensilas presentes nas antenas .....	35
4.2	Morfometria das facetas oculares.....	37
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>44</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Muito se discute sobre o declínio dos polinizadores e as causas propostas são diversas, como o uso difundido de agrotóxicos, mudanças climáticas, introdução e invasão de espécies exóticas e perda de habitat em larga escala (GRÜTER, 2020). Segundo o Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil (2019), as abelhas são consideradas o maior grupo de polinizadores, estando envolvidas na produção de alimentos por meio da polinização de culturas de alto valor econômico, como café (*Coffea arabica* L.), melão (*Cucumis melo* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), feijão (*Phaseolus* spp.), soja (*Glycine max* (L.) Merr.), entre outras, e estão associadas a 132 cultivos, sendo polinizadoras exclusivas de 74 destes.

Parte desse grupo é constituído pelas abelhas sociais, destacando-se a espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera, Apidae) ou abelha-do-mel, espécie mundialmente utilizada na polinização por ser generalista, possuir colônias com grande número de operárias, ter o manejo bem estabelecido, aumentando a eficiência desse serviço (BISPO DOS SANTOS et al., 2009; GILLESPIE; ELLE, 2018; IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012a). Essa espécie, porém, não é nativa no Brasil, e as colônias encontradas aqui são resultado de um processo de hibridização entre as subespécies introduzidas (SANTOS et al., 2012). Outro grupo de abelhas sociais com importância agrícola são as abelhas-sem-ferrão ou Meliponini, eficientes na polinização de plantas nativas e culturas economicamente relevantes (IMPERATRIZ-FONSECA et al., 2012b).

Abelhas-sem-ferrão pertencem ao grupo das abelhas corbiculadas (Hymenoptera, Apidae), caracterizadas pela presença da corbícula, uma estrutura presente nas pernas traseiras que as permite carregar pólen, e são diferenciadas das outras abelhas que pertencem a esse grupo, especialmente, pela ausência de ferrão funcional e pela venação reduzida das asas (GRÜTER, 2020). Possuem papel significativo na produção de alimentos, pois são responsáveis pela polinização de 52 cultivos e visitantes florais de 107 (BPBES/REBIPP, 2019).

Nas culturas polinizadas ou visitadas pelas abelhas geralmente são utilizados diversos tipos de agrotóxicos, sendo os inseticidas mais diretamente tóxicos para os polinizadores (MAIN et al., 2020). Mas no campo é comum que inseticidas sejam utilizados em associação com outros agrotóxicos, como os fungicidas, pois foram detectados no pólen e néctar como misturas, indicando que as abelhas operárias entram em contato não com agrotóxicos individuais, mas sim com variadas combinações de produtos, que podem apresentar efeitos aditivos e/ou sinérgicos (LI et al., 2023; SGOLASTRA et al., 2020).

Os neonicotinoides, como o tiametoxam, compõem uma classe de inseticidas que tem sido associada ao declínio de populações de abelhas, pois têm como alvo o sistema nervoso central dos insetos, causando um estado de hiperexcitação e morte (MAIN et al., 2020; JESCHKE et al., 2011). Contudo, a exposição a concentrações subletais desses compostos pode não levar à morte, mas comprometer funções motoras, aprendizagem, orientação, dificultando o forrageamento e a alimentação (BERNARDES et al., 2022; MIOTELO et al., 2022; ZHANG et al., 2022).

Os fungicidas, por sua vez, não têm abelhas como organismos-alvo, o que possibilita sua utilização mesmo na época da floração. Porém, estudos demonstraram que esses compostos podem causar declínio de populações e efeitos semelhantes à deficiência nutricional nas colônias devido a interferências no metabolismo e aquisição de alimento (DEGRANDI-HOFFMAN et al., 2015; DEGRANDI-HOFFMAN; CHEN; SIMONDS, 2013). Pettis et al. (2013) detectaram fungicidas no pólen coletado por abelhas, sendo que dois deles, o clorotalonil e o miclobutanil, têm efeitos semelhantes ao inseticida imidacloprido no aumento da mortalidade de células intestinais.

Atualmente, a espécie mundialmente utilizada como organismo-teste para ensaios de toxicidade em abelhas é *A. mellifera*, por ter ampla distribuição e biologia bem conhecida, mas há incertezas sobre se ela pode ser considerada representativa para proteger as abelhas nativas do Brasil (IBAMA, 2017; PIRES; TOREZANI, 2018).

Para preencher essa lacuna, é preciso conhecer a biologia das espécies de abelhas nativas por meio de novos estudos, de modo a levantar dados sobre as vias de exposição para indivíduos em diferentes estágios de vida, adultos e larvas (BIRELEY et al., 2019; IBAMA, 2017). Esforços nessa direção resultaram em uma matriz de seleção de espécies nativas para avaliação de risco, que considera alguns requisitos importantes como, associação com culturas relevantes, distribuição geográfica, importância para polinização e tamanho da colônia (PIRES; TOREZANI, 2018).

Uma das espécies que se encaixa nesses requisitos é a *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae), devido às similaridades com uma das espécies prioritárias para avaliação de risco, a *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) (Hymenoptera, Apidae) (PIRES; TOREZANI, 2018). Além disso, atua como polinizadora e/ou visitante floral de espécies nativas, como juá-fruta, gabirola e umbu, e exóticas de grande importância econômica, como o café, possui colônias populosas e se mostrou promissora em ensaios ecotoxicológicos (ROSA-FONTANA et al., 2020; BPBES/REBIPP, 2019).

Estudos preliminares demonstraram que a exposição das larvas de abelhas do gênero *Scaptotrigona* a concentrações subletais de um inseticida organofosforado pode prejudicar o desenvolvimento dos indivíduos, resultando em adultos com menor massa corporal, deformidades nas asas, antenas e aparato bucal (DORNELES et al., 2021). Por sua vez, a exposição de abelhas adultas de *Apis cerana* Fabricius, 1793 (Hymenoptera, Apidae) a concentrações subletais de inseticidas no campo resultou na redução do tamanho das facetas oculares (CHAKRABARTI; SARKAR; BASU, 2019), assim como foram observadas alterações em número e formato das sensilas antenais desses indivíduos (CHAKRABARTI et al., 2015).

Apesar das evidências sobre efeitos adversos causados por fungicidas em populações de abelhas, não há dados na literatura referentes à exposição a piraclostrobina e seus efeitos nos sistemas visual e olfativo. Mas especificamente abelhas do gênero *Scaptotrigona* dependem da associação com um fungo para realizar a metamorfose (PALUDO et al., 2018). Sendo nessa fase que os sistemas visual e olfativo se desenvolvem, a exposição das larvas a concentrações subletais deste composto pode influenciar nesse processo. Tais alterações podem prejudicar o serviço de polinização realizado pelas abelhas, uma vez que é por meio da visão e olfato que elas fazem o reconhecimento floral para captação de recursos (pólen e néctar) (VARASSIN; AMARAL-NETO, 2014).

O contexto aqui apresentado evidencia a necessidade de novos estudos que colaborem para o preenchimento das lacunas do conhecimento acerca da biologia das espécies nativas de abelhas-sem-ferrão. Portanto, o presente trabalho se propõe a investigar se concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina, isolados e combinados, afetam o desenvolvimento e formação de estruturas presentes nos órgãos sensoriais, importantes para a orientação e, conseqüentemente, para o processo de polinização. *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) foi selecionada por sua importância ecológica na polinização e pelo potencial de ser utilizada para testes de avaliação de risco de agrotóxicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi verificar se a exposição a concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina, isolados e combinados, afeta o desenvolvimento pós-embrionário e a formação de órgãos sensoriais importantes para orientação e forrageamento da *S. postica*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar como ocorre o desenvolvimento das larvas expostas aos agrotóxicos em condição *in vitro* por meio da avaliação das taxas de pupação, emergência, mortalidade e dos tempos de desenvolvimento;
- Investigar se a exposição oral das larvas a concentrações subletais do inseticida tiametoxam e do fungicida piraclostrobina afeta a morfologia de estruturas que compõem os órgãos do sistema olfativo e visual das abelhas recém-emergidas.

## 3. REFERÊNCIAS

- BERNARDES, R. C. et al. Toxicological assessment of agrochemicals on bees using machine learning tools. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127344, 2022.
- BPBES/REBIPP. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. Marina Wolowski; Kayna Agostini; André Rodrigo Rech; Isabela Galarda Varassin; Márcia Maués; Leandro Freitas; Liedson Tavares Carneiro; Raquel de Oliveira Bueno; Hélder Consolaro; Luisa Carvalheiro; Antônio Mauro Saraiva; Cláudia Inês da Silva. Maíra C. G. Padgurschi (Org.). 1ª edição, São Carlos, SP: Editora Cubo. 2019. 184 páginas. <http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>.
- 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.
- BISPO DOS SANTOS, S. et al. Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Genetics and Molecular Research**. Disponível em: [www.funpecrp.com.br](http://www.funpecrp.com.br).
- CHAKRABARTI, P. et al. Field populations of native Indian honey bees from pesticide intensive agricultural landscape show signs of impaired olfaction. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12504, 2015.
- CHAKRABARTI, P.; SARKAR, S.; BASU, P. Pesticide induced visual abnormalities in Asian honey bees (*Apis cerana* L.) in intensive agricultural landscapes. **Chemosphere**, v. 230, p. 51–58, 2019.
- 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.
- DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; SIMONDS, R. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Insects**, v. 4, n. 1, p. 71–89, 2013.

DORNELES, A. L. et al. Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. **Environmental Pollution**, v. 272, p. 116414, 2021.

GILLESPIE, S.; ELLE, E. Non-native plants affect generalist pollinator diet overlap and foraging behavior indirectly, via impacts on native plant abundance. **Biological Invasions**, v. 20, n. 11, p. 3179–3191, 2018.

GRÜTER, C. **Stingless Bees**. Cham: Springer International Publishing, 2020.

IBAMA. **Nota técnica sobre avaliação de risco de agrotóxicos para insetos polinizadores e lacunas de conhecimento**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/component/phocadownload/file/2731-nota-tecnica-sobre-avaliacao-de-risco-de-agrotoxicos-para-insetos-polinizadores-e-lacunas-de-conhecimento>>. Acesso em: 19 set. 2021.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. **Polinizadores no Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012a. 488 p.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. **Polinizadores e Polinização – um Tema Global**. Em: Polinizadores do Brasil. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012b. p. 25–45.

JESCHKE, P. et al. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. **J. Agric. Food Chem**, v. 59, p. 2897–2908, 2011.

LI, W. et al. Mixture effects of thiamethoxam and seven pesticides with different modes of action on honey bees (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 2679, 2023.

MAIN, A. R. et al. Beyond neonicotinoids - Wild pollinators are exposed to a range of pesticides while foraging in agroecosystems. **Science of The Total Environment**, v. 742, p. 140436, 2020.

MIOTELO, L. et al. A food-ingested sublethal concentration of thiamethoxam has harmful effects on the stingless bee *Melipona scutellaris*. **Chemosphere**, v. 288, p. 132461, 2022.

PALUDO, C. R. et al. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1122, 2018.

PETTIS, J. S. et al. Crop Pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70182, 2013.

PIRES, C. S. S.; TOREZANI, K. R. DE S. **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos**. Brasília: 2018.

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.

SANTOS, G. M. et al. Invasive Africanized honeybees change the structure of native pollination networks in Brazil. **Biological Invasions**, v. 14, n. 11, p. 2369–2378, 2012.

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

VARASSIN, I. G.; AMARAL-NETO, L. P. DO. Atrativos. Em: **Biologia da Polinização**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Projeto Cultural, 2014. p. 0–527.

ZHANG, Z. Y. et al. The effects of sublethal doses of imidacloprid and deltamethrin on honeybee foraging time and the brain transcriptome. **Journal of Applied Entomology**, v. 146, n. 9, p. 1169–1177, 2022.

## ARTIGO 1

### Concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina interferem no desenvolvimento pupal de *Scaptotrigona postica*

#### RESUMO

A exposição de abelhas a agrotóxicos durante o forrageamento é uma preocupação crescente, pois estes podem ser transportados para as colmeias por meio de recursos contaminados, como pólen e néctar. Estudos ecotoxicológicos revelaram efeitos subletais de agrotóxicos em abelhas, mas dados específicos para abelhas-sem-ferrão são limitados. O sistema de alimentação observado nessas espécies pode levar à exposição das larvas a agrotóxicos por meio do alimento, através das vias tópica e oral. Apesar de serem comumente utilizados como misturas, os efeitos da combinação entre inseticidas e fungicidas para abelhas-sem-ferrão são pouco estudados. Esse estudo teve o objetivo de avaliar os efeitos de concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina, isolados e combinados, no desenvolvimento pós-embrionário de *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). Para isso, larvas foram expostas ao ingrediente ativo destes compostos nas concentrações: 0,044 ng i.a./larva de tiametoxam e 69,675 ng i.a./larva de piraclostrobina. O desenvolvimento das larvas e pupas foi monitorado diariamente e os parâmetros entrada no 5º instar larval, defecação, pupação (e suas fases), emergência e mortalidade, foram registrados. Adicionalmente, os tempos em que os indivíduos atingiram cada estágio de desenvolvimento foram analisados. Os resultados demonstraram que a combinação entre o tiametoxam e piraclostrobina diminuiu a taxa de emergência das pupas, indicando possíveis efeitos sinérgicos. O tiametoxam promoveu adiantamento na fase de pupa de olhos brancos, enquanto o piraclostrobina e a combinação resultaram no atraso das fases de pupa de olhos rosas, pupa de olhos pretos e na emergência das abelhas. Este estudo concluiu que a exposição a concentrações subletais do tiametoxam e piraclostrobina, isolados e combinados, afetou a emergência e os tempos de desenvolvimento das pupas de *S. postica*.

**Palavras-chave:** Abelhas-sem-ferrão, inseticidas, fungicidas, desenvolvimento larval, efeitos combinados de agrotóxicos.

## **Sublethal concentrations of thiamethoxam and pyraclostrobin interfere with the pupal development of *Scaptotrigona postica***

### **ABSTRACT**

The exposure of bees to pesticides during foraging is a growing concern, as these can be carried to the hives through contaminated resources such as pollen and nectar. Ecotoxicological studies show sublethal effects of pesticides on bees, but specific data for stingless bees are limited. The feeding system observed in these species can lead to larval exposure to pesticides through food, via topical and oral routes. Despite their frequent use in mixtures, the effects of combining insecticides and fungicides on stingless bees are understudied. This study aimed to evaluate the effects of sublethal concentrations of thiamethoxam and pyraclostrobin, individually and combined, on the post-embryonic development of *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). For this, we exposed larvae to the active ingredient of these compounds at concentrations of 0.044 ng a.i./larva for thiamethoxam and 69.675 ng a.i./larva for pyraclostrobin. We monitored the development of larvae and pupae daily and recorded parameters such as entry into the 5th larval instar, defecation, pupation (and its stages), emergence, and mortality. In addition, we analyzed the times for each developmental stage. The results demonstrated that thiamethoxam and pyraclostrobin combined reduced pupal emergence rates, indicating possible synergistic effects. Thiamethoxam advanced the white-eyed pupal phase, while pyraclostrobin and combination resulted in delays in the pink-eyed, and black-eyed pupal stages and in bee emergence. Our study concluded that exposure to sublethal concentrations of thiamethoxam and pyraclostrobin, individually and combined, affected the pupal development times and the emergence of *S. postica*.

**Keywords:** Stingless bees, insecticides, fungicides, larval development, pesticides mixtures.

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos holometábolos e cujo desenvolvimento se caracteriza pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (MICHENER, 2007). Em abelhas-sem-ferrão, as rainhas ovipositam os ovos fecundados sobre o alimento larval, depositado previamente pelas operárias, que imediatamente fecham as células de cria após a oviposição (GRÜTER, 2020). Esse tipo de alimentação é chamado de “aprovisionamento em massa”, no qual as larvas terão acesso à quantidade depositada para completar seu desenvolvimento (CHAM et al., 2019).

Durante o forrageamento, as operárias podem entrar em contato com agrotóxicos no campo, que podem ser trazidos para as colmeias por meio de recursos como pólen e néctar, utilizados para a produção do alimento que será ofertado às novas crias (RORTAIS et al., 2005). E, devido à alimentação observada em abelhas-sem-ferrão, as larvas serão expostas ao alimento simultaneamente pelas vias de contato tópico e oral (Figura 3A) (CHAM et al., 2019).

Estudos relacionados à ecotoxicologia indicam que concentrações residuais de agrotóxicos encontradas em colmeias de abelhas sociais e ninhos de solitárias causam efeitos subletais que prejudicam o forrageamento, aprendizagem e memória (BLACQUIÈRE et al., 2012; DECOURTYE et al., 2004a, 2004b; SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2001). Esses estudos são concentrados em abelhas que não são brasileiras, como *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), *Bombus* spp. e *Osmia* spp. (Hymenoptera: Apidae) (EFSA, 2023; TOSI et al., 2022). Mas as diferenças no sistema de alimentação larval das abelhas-sem-ferrão enfatizam a necessidade de testes específicos para melhor entendimento do que ocorre quando as larvas são expostas a agrotóxicos trazidos para as colmeias (DORIGO et al., 2019).

Os insetos são os organismos-alvo dos inseticidas e estudos relacionados à exposição na fase larval de abelhas-sem-ferrão indicam redução na sobrevivência e alterações nos tempos de desenvolvimento, deformação, redução da massa corporal das pupas e abelhas emergidas e comprometimento da mobilidade (BARBOSA et al., 2015; BOTINA et al., 2023; ROSA et al., 2016; SEIDE et al., 2018).

Por sua vez, os fungicidas não têm insetos como organismos-alvo, sendo considerados seguros para as abelhas (FISHER et al., 2021). Mas estudos com abelhas-sem-ferrão demonstram que a exposição a fungicidas na fase adulta causa alterações locomotoras, redução nas taxas de respiração, lesões no intestino médio, diminuição da taxa de sobrevivência e bioacumulação (ALMEIDA et al., 2021; DOMINGUES et al., 2020; PRADO et al., 2020), porém, são escassos os dados para o período larval.

O tiametoxam é um inseticida altamente específico da classe dos neonicotinoides, que são amplamente usados pela sua eficiência, resultante do modo de ação, pois atuam diretamente no sistema nervoso dos insetos e tem baixa toxicidade para vertebrados (BASS; FIELD, 2018; MIOTELO et al., 2021). Espécies de abelhas-sem-ferrão, como a *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae), são mais sensíveis a este agrotóxico na fase adulta do que *A. mellifera*, que é a espécie atualmente utilizada como modelo para ensaios ecotoxicológicos (LOURENCETTI et al., 2023; OECD, 2016).

Os fungicidas do grupo das estrobirulinas, como o piraclostrobina, atuam na interrupção da produção de energia dos fungos por meio da inibição da respiração mitocondrial, e tem sido detectados no pólen de culturas visitadas por abelhas (DOMINGUES et al., 2020; ZALUSKI; JUSTULIN; ORSI, 2017). Como *S. postica* está intimamente associada ao fungo *Zygosaccharomyces* sp. (Saccharomycetales, Saccharomycetaceae), é importante que seja esclarecido se a presença de fungicidas no alimento larval tem potencial de inibir seu crescimento e interferir na metamorfose.

Além disso, estudos relacionados aos efeitos da exposição a combinações entre inseticidas e fungicidas para espécies não-apis são escassos, sendo importante avaliar possíveis efeitos aditivos e/ou sinérgicos (BELSKY; JOSHI, 2020; IVERSON et al., 2019). Quando aplicados em misturas, podem ocorrer interações que potencializam estes efeitos, conforme resultados obtidos em testes com *A. mellifera*, que demonstraram a redução a sobrevivência de larvas e adultos (FISHER et al., 2017; SGOLASTRA et al., 2017; ZHU et al., 2014).

Como as abelhas-sem-ferrão são expostas a inseticidas e fungicidas durante o forrageamento e isso pode resultar na exposição das larvas por meio do alimento contaminado (DORIGO et al., 2019), é importante esclarecer se os efeitos destes agrotóxicos podem interferir no desenvolvimento das mesmas. Visto que estudos ecotoxicológicos são escassos para essas espécies (LIMA et al., 2016), especialmente relacionados aos efeitos da combinação de agrotóxicos, e que comumente as abelhas são expostas a misturas no campo, se faz necessário que testes direcionados sejam conduzidos.

Diante desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se concentrações subletais do inseticida tiametoxam e do fungicida piraclostrobina, isolados e combinados, interferem no desenvolvimento pós-embrionário (mortalidade, pupação e emergência) de *S. postica* exposta no período larval.

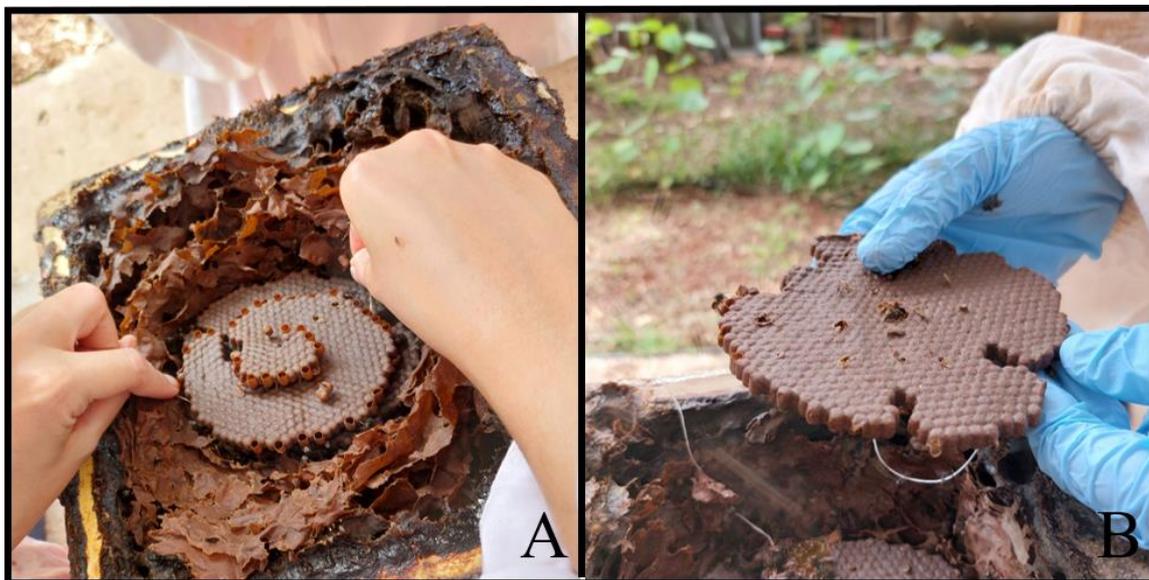
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Delineamento experimental

#### 2.1.1 Coleta do material biológico

Discos de cria de colônias não parentais de *S. postica* foram coletados no meliponário do Grupo de Pesquisa Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAs), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (22°18'22.9"S 47°22'53.1"W). Discos contendo ovos e larvas no primeiro estágio de desenvolvimento foram separados da colônia com auxílio de fio dental (Figura 1), armazenados em placas de Petri de vidro e acondicionados em caixas de isopor, onde foram levados ao Laboratório de Bioensaios. Imediatamente foi realizada a extração do alimento larval dos discos com ovos, enquanto discos com larvas foram armazenados na incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio). A extração foi realizada utilizando-se uma agulha apícola para desopercular as células de cria e, em seguida, o alimento foi coletado com micropipeta, transferido para tubos de centrifugação tipo Falcon de 50 mL e levado para a sala de preparo, onde foram realizadas as diluições seriadas com os ingredientes ativos.

**Figura 1.** Coleta dos discos de cria. (A) Separação do primeiro disco com auxílio de fio dental. (B) Disco recém-retirado da colônia.



Fonte: Autoria própria, 2023.

### 2.1.2 Concentrações obtidas dos agrotóxicos

As concentrações utilizadas nos bioensaios foram definidas com base na literatura disponível para os agrotóxicos selecionados, na ordem de ng/ $\mu$ L, e obtidas a partir dos ingredientes ativos.

O inseticida tiametoxam foi utilizado na concentração de 0,044 ng i.a./larva ou 0,00176 ng/ $\mu$ L, definida a partir do estudo de Rosa et al. (2016), sendo selecionada a menor concentração no qual foram observados efeitos significativos no desenvolvimento larval e pupal de *Scaptotrigona* aff. *depilis*. O ingrediente ativo utilizado foi tiametoxam PESTANAL™ (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>3</sub>S), padrão analítico Sigma-Aldrich, pureza  $\geq$  98,0%.

O fungicida piraclostrobina foi utilizado na concentração de 69,975 ng i.a./larva ou 2,787 ng/ $\mu$ L, definida a partir do estudo de Pettis et al. (2013), sendo baseada na concentração média deste fungicida detectada no pólen trazido para as colônias por abelhas que visitam culturas de abóbora. O ingrediente ativo utilizado foi piraclostrobina PESTANAL™ (C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), padrão analítico Sigma-Aldrich, pureza  $\geq$  98,0%.

Para validação do experimento segundo as diretrizes da OECD nº 239 (2016), o inseticida dimetoato foi utilizado como controle positivo, mas para adequar-se a exposição para *S. postica*, a concentração foi baseada no estudo de Rosa-Fontana et al. (2020), que definiu a CL<sub>50</sub> para 24h em 172,48 ng i.a./larva ou 6,899 ng/ $\mu$ L. O ingrediente ativo utilizado foi dimetoato (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>PS<sub>2</sub>), Cayman Chemical, pureza  $\geq$  98,0%.

### 2.1.3 Bioensaios de exposição

As condições dos bioensaios foram baseadas no método descrito por Rosa-Fontana et al. (2020) para criação de *S. postica*.

Os bioensaios constituíram em três repetições, cada uma contendo seis grupos experimentais, sendo: CTL (Controle negativo), ACE (Controle solvente - acetona), DIM (Controle positivo - dimetoato), TMX (Tiametoxam), PIR (Piraclostrobina) e TMX+PIR (Combinação). A partir de uma solução estoque de 1000 ng/ $\mu$ L (10 mg i.a./10 mL alimento larval), foi realizada uma diluição seriada até obter-se as concentrações definidas para cada ingrediente ativo.

Como o piraclostrobina não é solúvel em água, ele foi diluído em 40% de acetona (4 mL) e, posteriormente, adicionado ao alimento larval (10 mL). Após as sucessivas diluições, a concentração final de acetona no alimento larval é de 0,4% e, portanto, não excede o valor

permitido pela OECD n° 239 (2016), de 2% no alimento que será oferecido às larvas. A mesma proporção de acetona/alimento foi utilizada no grupo ACE.

Foram utilizadas placas de acrílico com 100 cavidades de mesmas dimensões das células de cria naturais (Patente n°: BR 1020220011354), as quais foram esterilizadas com álcool 70% e deixadas para secar no fluxo laminar sob luz UV (ultravioleta). Na sala de bioensaios, foram utilizados um umidificador de ar, um vaporizador e uma chaleira com água fervente para manter a umidade acima de 75%, de modo a não ocorrer ressecamento do alimento larval e das larvas no momento da transferência.

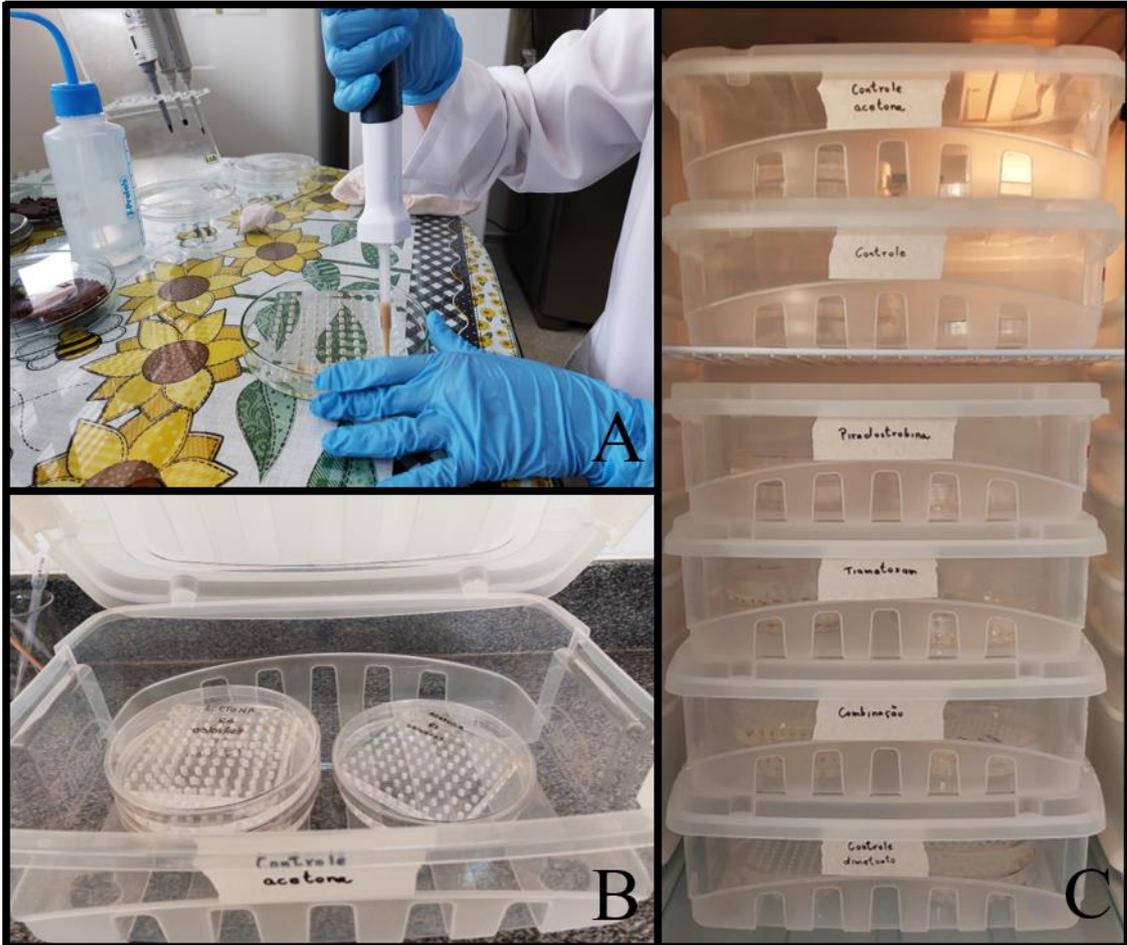
As cavidades das placas de acrílico foram preenchidas utilizando-se uma micropipeta de repetição, onde cada uma recebeu 25 µL de alimento, valor estabelecido por Dorigo et al. (2018), correspondente ao volume total ingerido por *S. postica* durante a fase larval (Figura 2A). Em seguida, as larvas contidas nos discos recém-coletados foram transferidas com auxílio de agulha apícola. Cada placa de acrílico recebeu 20 larvas por grupo experimental, sendo necessárias 360 larvas para realizar as transferências dos seis grupos em triplicata.

Após a transferência, as placas de acrílico foram acondicionadas em placas de Petri contendo água destilada ao fundo (Figura 2B). Essas placas foram colocadas em caixas organizadoras de plástico separadas de acordo com cada grupo experimental e, então, levadas para a incubadora B.O.D. a 28°C (Figura 2C).

Utilizando um termo-higrômetro como base, a umidade relativa foi controlada do seguinte modo: inicialmente mantida a 95±5% por meio da adição de água destilada nas placas de Petri; após 72 horas de incubação, reduzida para 85% por meio da adição de KCl; e após 48 horas (120 horas após a transferência), reduzida para 75% por meio da adição NaCl, na qual permaneceu até o final do experimento.

Após 24 horas da transferência, o progresso do experimento foi monitorado por meio da observação e registro dos parâmetros biológicos: entrada no 5° instar larval, defecação, pupação (e suas fases), emergência e mortalidade.

**Figura 2.** Preenchimento e armazenamento das placas acrílicas. (A) Placas acrílicas preenchidas com micropipeta. (B) Placas de Petri dentro das caixas organizadoras. (C) Caixas organizadoras dentro da B.O.D.



Fonte: A autoria própria, 2023.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* RStudio v. 4.2.2 (R Core Team, 2022), utilizando Modelos Lineares Generalizados (GLM), pois os dados não apresentaram normalidade dos resíduos segundo o teste de Shapiro-Wilk. As médias, desvio e erro padrão foram calculados para os seguintes parâmetros: mortalidade/número inicial de larvas; pupação/número inicial de larvas; emergência/número inicial de larvas e emergência/número inicial de pupas.

A distribuição, selecionada de acordo com o melhor ajuste do modelo, foi a binomial para a mortalidade/número inicial de larvas; quase-binomial para a pupação/número inicial de larvas; e quase-Poisson para a emergência/número inicial de larvas e emergência/número inicial de pupas. A adequação do modelo foi feita pela análise do gráfico

de probabilidade normal com envelope simulado, obtido pela função “hnp” (MORAL; HINDE; DEMETRIO, 2018). Após a obtenção dos resultados pelo modelo escolhido, as médias dos grupos foram comparadas pelo pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%.

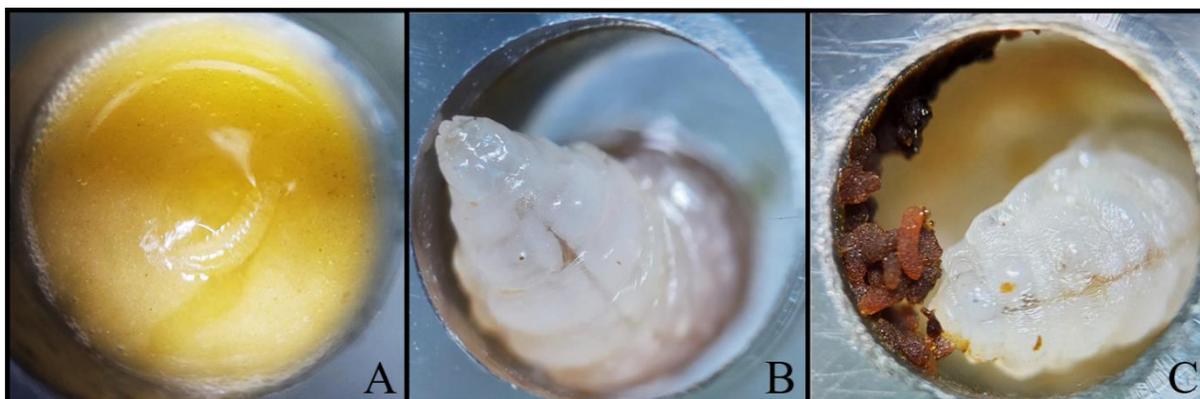
O tempo para as fases 5º instar (fase de alimentação), defecação, pupa de olhos brancos, pupa de olhos rosas, pupa de olhos marrons, pupa de olhos pretos e emergência foi analisado por meio de curvas de Kaplan-Meier, obtidas pelos pacotes “survival” e survminer” (KASSAMBARA; KOSINSKI; BIECEK, 2021; THERNEAU, 2023). A comparação dos grupos foi feita por regressão de Cox pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Taxas de pupação, emergência e mortalidade

Os bioensaios permitiram o acompanhamento progressivo dos estágios de desenvolvimento de *S. postica* em condições laboratoriais. Durante a fase larval, as larvas de primeiro instar (Figura 3A) se alimentaram até atingir o 5º instar (Figura 3B) e, em seguida, ocorreu a defecação (Figura 3C).

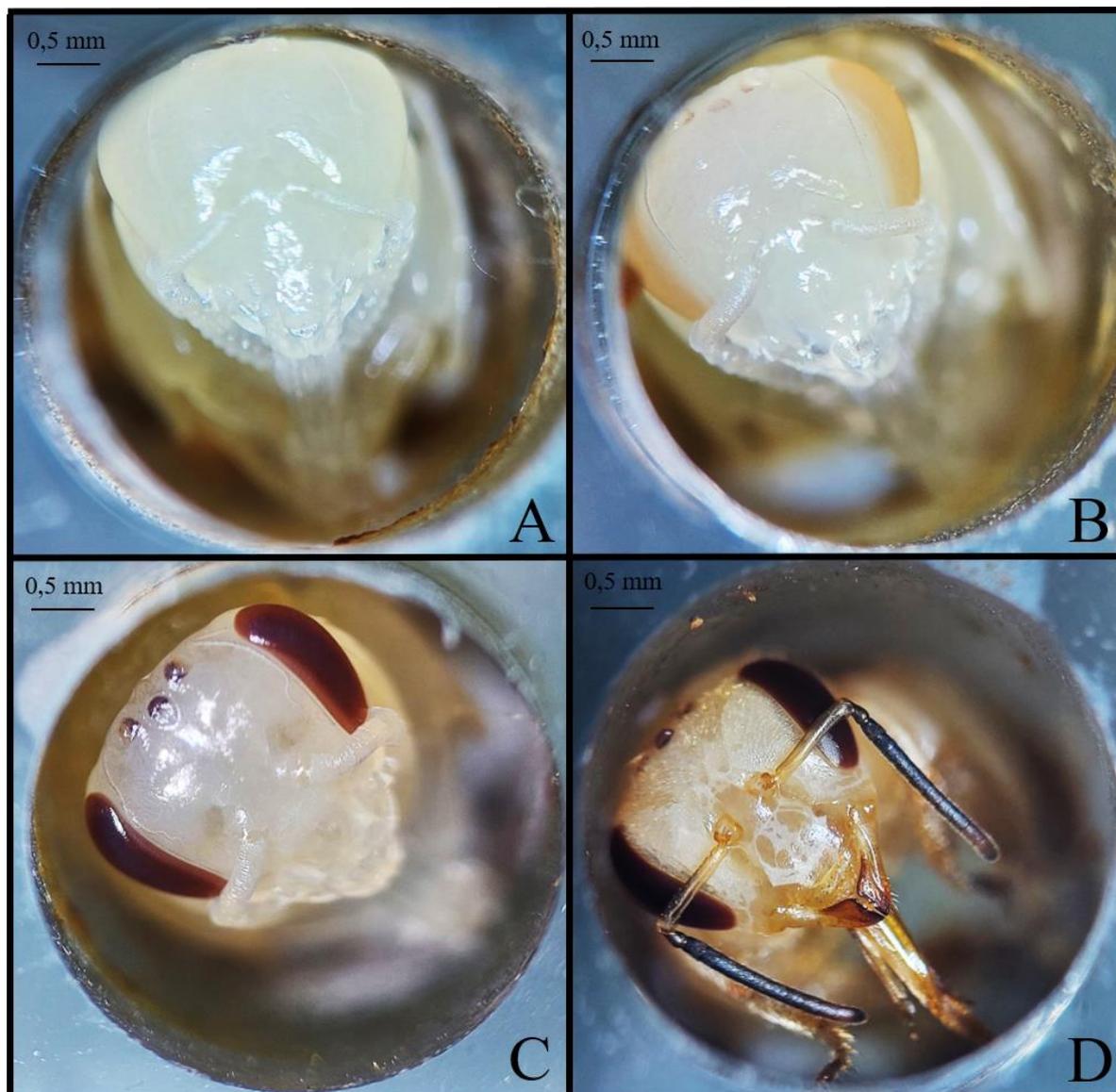
**Figura 3.** Estágios de desenvolvimento larval de *S. postica*. (A) Larva de 1º instar, 24h após a eclosão do ovo. (B) Larva de 5º instar. (C) Larva na fase de defecação.



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

Posteriormente, iniciou-se o processo de metamorfose e as larvas tornaram-se pupas, passando consecutivamente pelas fases de pupas de olhos brancos (Figura 4A), pupas de olhos rosas (Figura 4B), pupas de olhos marrons (Figura 4C), pupas de olhos pretos (Figura 4D) e emergência.

**Figura 4.** Estágios de desenvolvimento pupal de *S. postica*. (A) Pupa de olhos brancos. (B) Pupa de olhos rosas. (C) Pupa de olhos marrons. (D) Pupa de olhos pretos.



Fonte: Autoria própria, 2023.

A progressão das fases de desenvolvimento de *S. postica* foram as mesmas observadas no protocolo proposto por Rosa-Fontana et al. (2020). As taxas de mortalidade, pupação e emergência obtidas nos bioensaios são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Mortalidade, pupação e emergência de *S. postica* (médias  $\pm$  desvio padrão).

Grupos	1 Mortalidade (%)	2 Pupação (%)	3 Emergência/ larvas (%)	4 Emergência/ pupas (%)
CTL	20,00 $\pm$ 15,00 a	66,67 $\pm$ 18,93 bc	58,33 $\pm$ 20,20 b	86,20 $\pm$ 7,86 b
ACE	21,66 $\pm$ 5,77 a	51,67 $\pm$ 2,89 b	40,00 $\pm$ 15,00 b	76,67 $\pm$ 25,17 ab
DIM	68,33 $\pm$ 11,54 b	21,66 $\pm$ 2,89 a	16,67 $\pm$ 2,89 a	76,67 $\pm$ 2,89 ab
TMX	13,33 $\pm$ 7,63 a	81,67 $\pm$ 5,77 c	63,33 $\pm$ 2,89 b	77,90 $\pm$ 8,13 b
PIR	15,00 $\pm$ 8,66 a	80,00 $\pm$ 10,00 c	56,66 $\pm$ 15,27 b	70,44 $\pm$ 15,52 ab
TMX+PIR	20,00 $\pm$ 5,00 a	78,33 $\pm$ 10,40 c	36,66 $\pm$ 2,89 ab	47,04 $\pm$ 2,80 a

CTL: Controle negativo; ACE: Controle solvente - acetona; DIM: Controle Positivo - dimetoato; TMX: Tiametoxam; PIR: Piraclostrobina; TMX+PIR: Combinação.

<sup>1</sup> Taxa de mortalidade: número de larvas mortas/número inicial de larvas; <sup>2</sup> Taxa de pupação: número de pupas de olhos brancos/número inicial de larvas; <sup>3</sup> Taxa de emergência/larvas: número de abelhas emergidas/número inicial de larvas; <sup>4</sup> Taxa de emergência/pupas: número de abelhas emergidas/número de pupas vivas. As letras distintas na mesma coluna indicam que os grupos diferem entre si pelo pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Em relação às taxas de mortalidade larval, não houve diferenças significativas entre os grupos CTL, ACE, TMX, PIR e TMX+PIR, que demonstraram ser estatisticamente iguais entre si. O grupo DIM apresentou diferença significativa para os demais grupos, com a maior taxa de mortalidade, de 68,33%, validando o bioensaio de acordo com o protocolo nº 239 da OECD (2016).

Em relação às taxas de pupação, os grupos expostos TMX, PIR e TMX+PIR apresentaram maiores taxas de pupação do que o grupo ACE, porém, em relação ao grupo CTL, nenhum destes apresentou diferenças significativas. O grupo DIM demonstrou ser estatisticamente diferente dos demais grupos, apresentando a menor taxa de pupação.

Em relação à taxa de emergência das larvas, os grupos CTL, ACE, TMX, PIR e TMX+PIR são estatisticamente iguais entre si e, com exceção do TMX+PIR, apresentaram diferença significativa do grupo DIM, que resultou em uma taxa de emergência mais baixa do que os demais. O grupo TMX+PIR não diferiu significativamente de nenhum dos outros grupos experimentais.

Em relação à emergência das pupas, o grupo CTL não diferiu estatisticamente dos grupos ACE, DIM, TMX e PIR, mas diferiu do TMX+PIR, que resultou em uma menor taxa de emergência. Por sua vez, o grupo TMX diferiu estatisticamente do grupo TMX+PIR.

## 4.2 Tempo em cada fase de desenvolvimento

Os tempos, em dias, foram obtidos por grupo experimental em cada fase de desenvolvimento. Em relação ao período larval, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e grupos expostos nas fases de 5º instar (Figura 5) e defecação (Figura 6). Em relação ao período pupal, foram observadas diferenças significativas nas fases pupa de olhos brancos, pupa de olhos rosas, pupa de olhos pretos e na emergência.

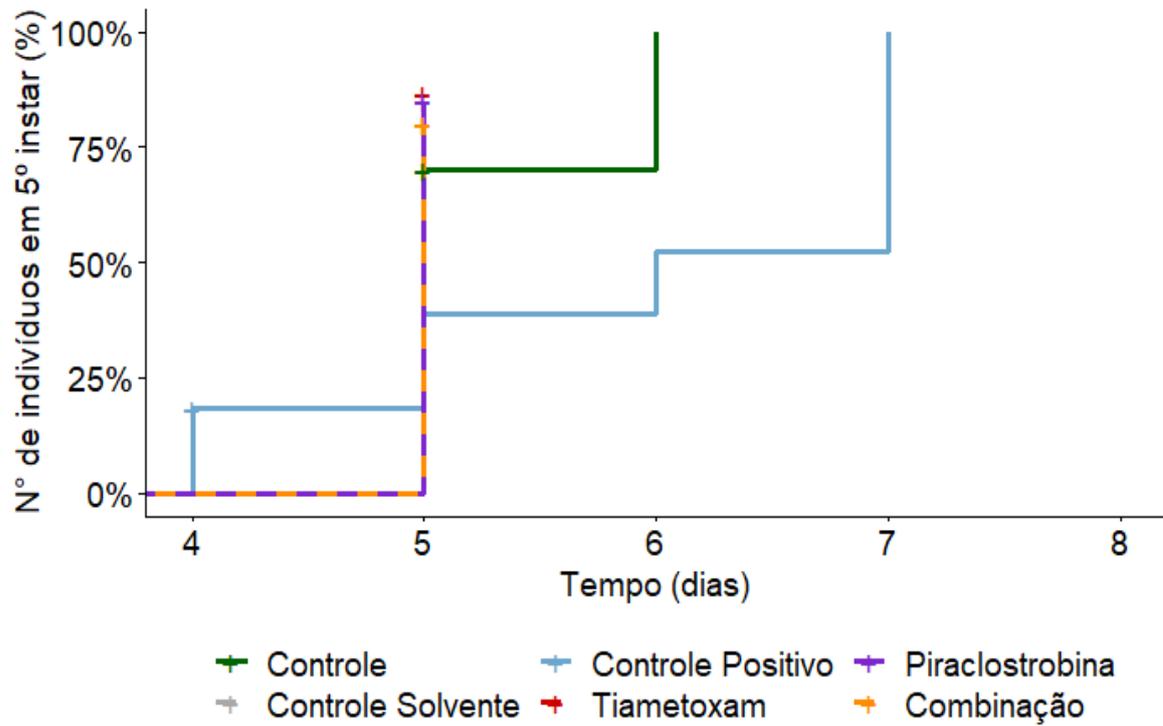
Na fase pupa de olhos brancos, foi observado que mais de 50% dos indivíduos expostos ao tiametoxam atingiram essa fase no 15º dia, demonstrando adiantamento em relação aos demais grupos (Figura 7).

Na fase pupa de olhos rosas, foi observado um adiantamento no grupo controle solvente, pois 50% dos indivíduos atingiram essa fase no 19º dia. Por sua vez, o grupo combinação apresentou um atraso em relação aos demais, pois mais de 50% dos indivíduos atingiram essa fase no 23º dia (Figura 8).

Na fase pupa de olhos marrons, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 9). Na fase pupa de olhos pretos, foi observado um atraso do grupo exposto à combinação do tiametoxam e piraclostrobina, pois 50% dos indivíduos atingiram essa fase no 37º dia, tempo superior ao observado nos demais grupos (Figura 10).

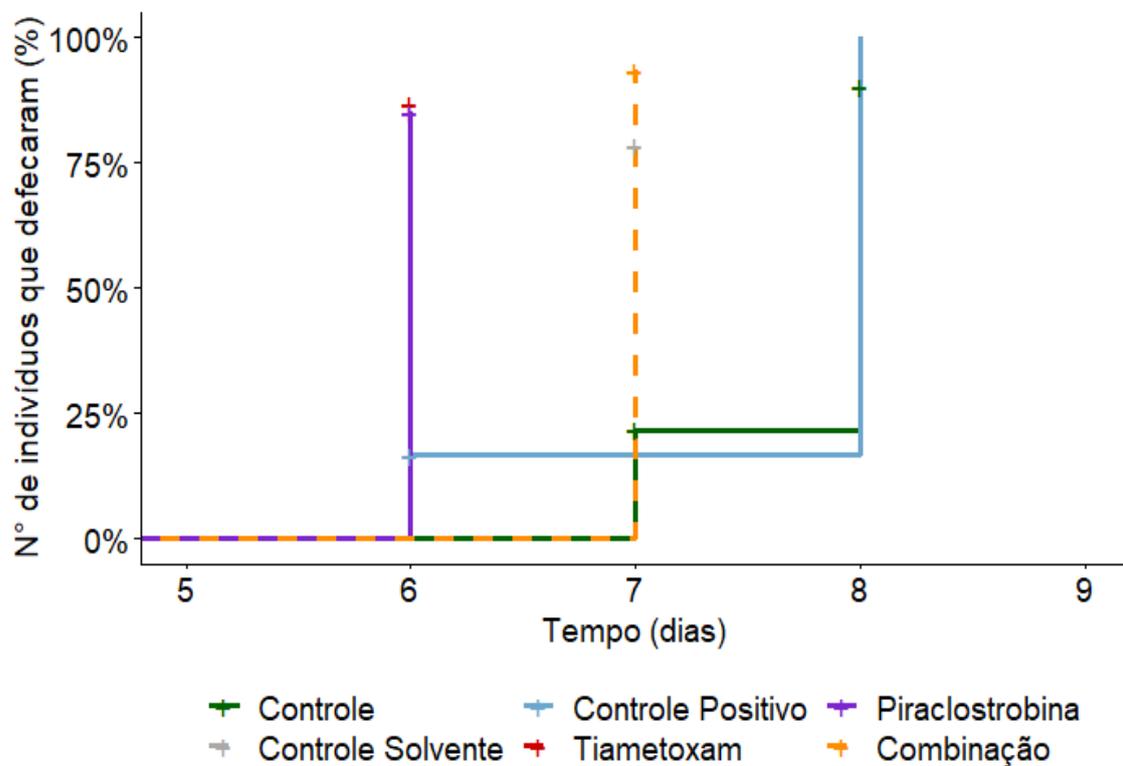
Na fase de emergência, foi observado um atraso dos grupos piraclostrobina e combinação em relação aos demais, pois demorou 42 dias para que 50% dos indivíduos emergissem (Figura 11).

**Figura 5.** Tempo em que os indivíduos de *S. postica* atingiram o 5º instar larval.



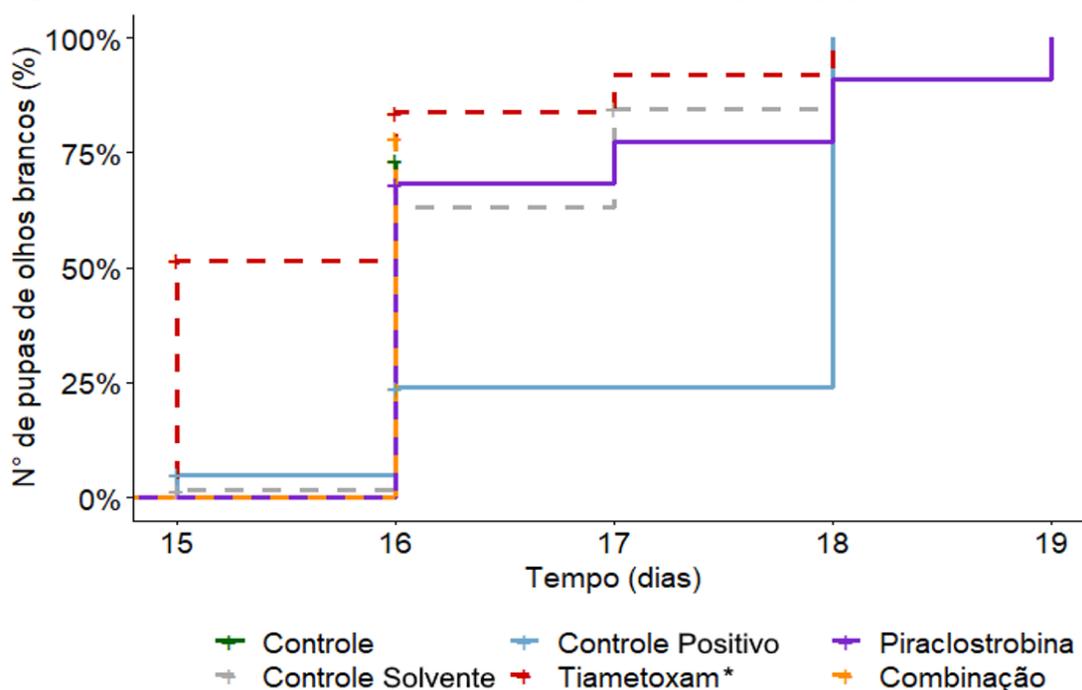
Tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram o 5º instar. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos expostos e os grupos controle (\*p < 0,05).

**Figura 6.** Tempo em que os indivíduos de *S. postica* defecaram.



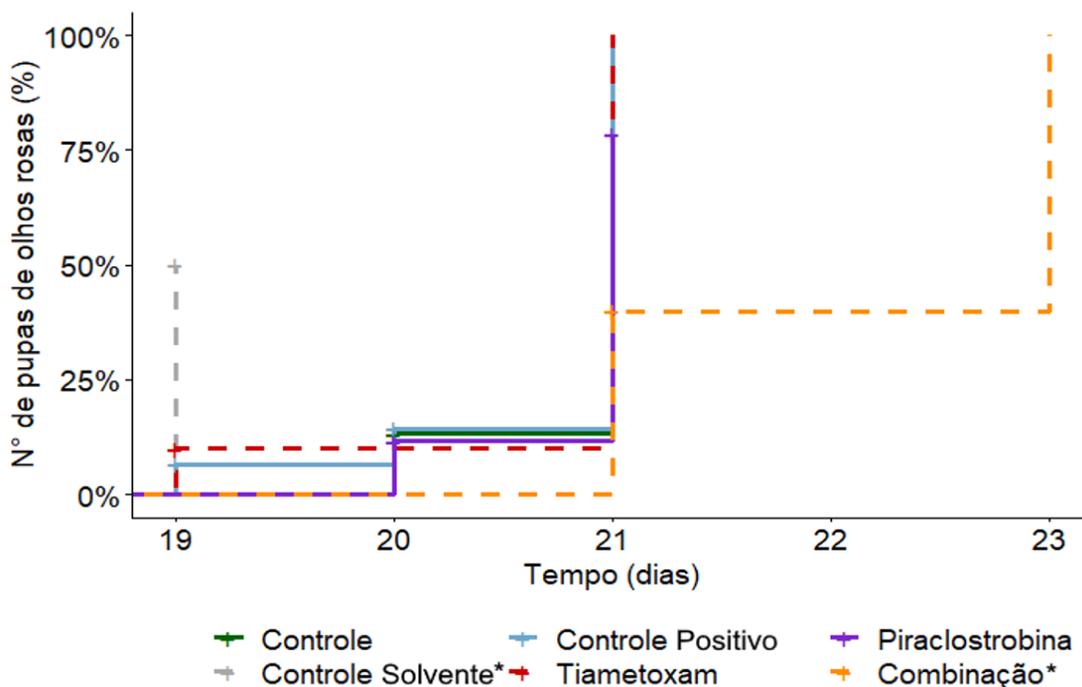
Tempo (em dias) que os indivíduos (%) defecaram. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos expostos e os grupos controle (\*p < 0,05).

**Figura 7.** Tempo em que os indivíduos de *S. postica* atingiram pupa de olhos brancos.



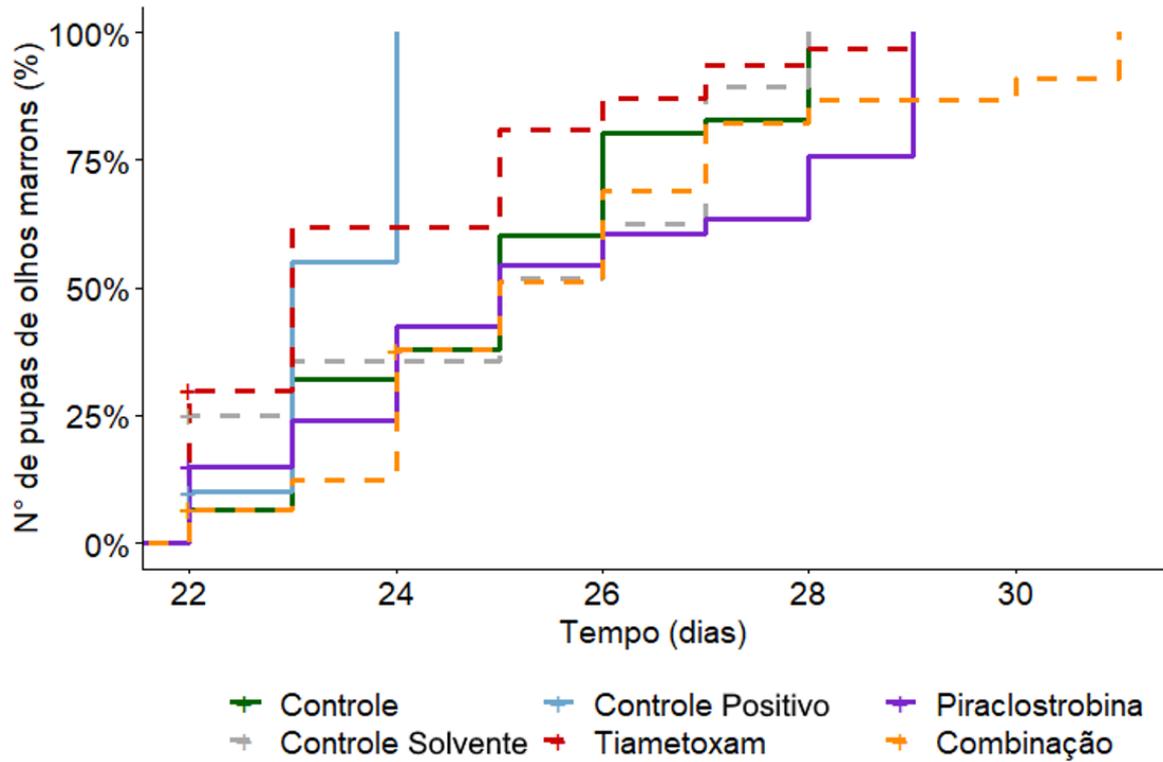
Tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram pupa de olhos brancos. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos expostos e os grupos controle (\* $p < 0,05$ ).

**Figura 8.** Tempo em que os indivíduos de *S. postica* atingiram pupa de olhos rosas.



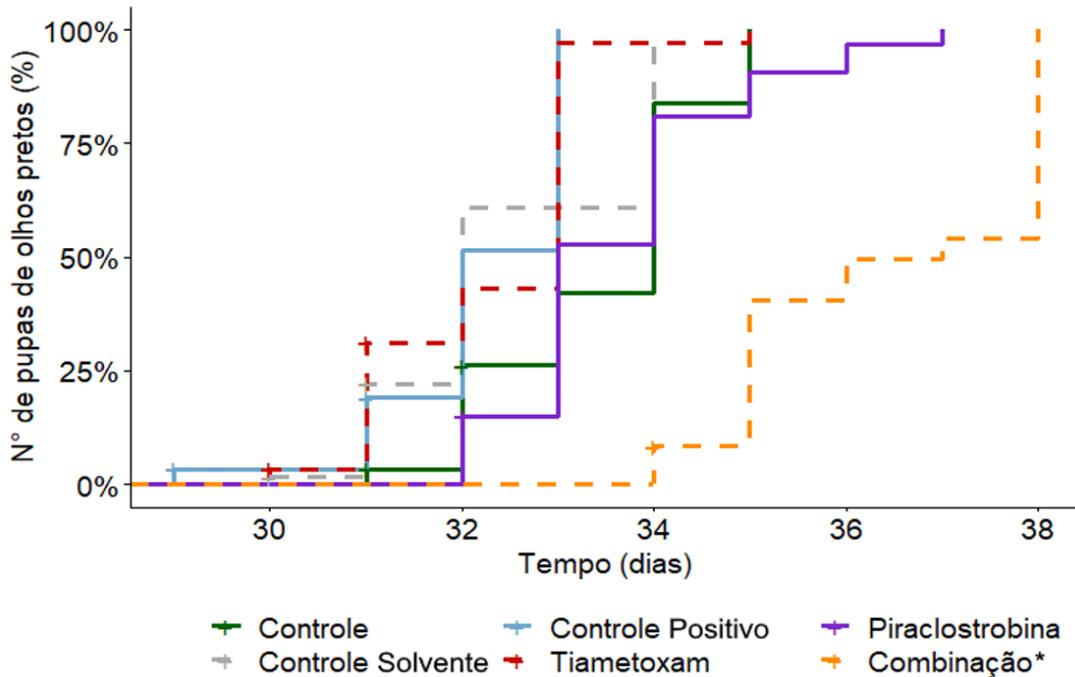
Tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram pupa de olhos rosas. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos expostos e os grupos controle (\* $p < 0,05$ ).

**Figura 9.** Tempo em que os indivíduos de *S. postica* atingiram pupa de olhos marrons.



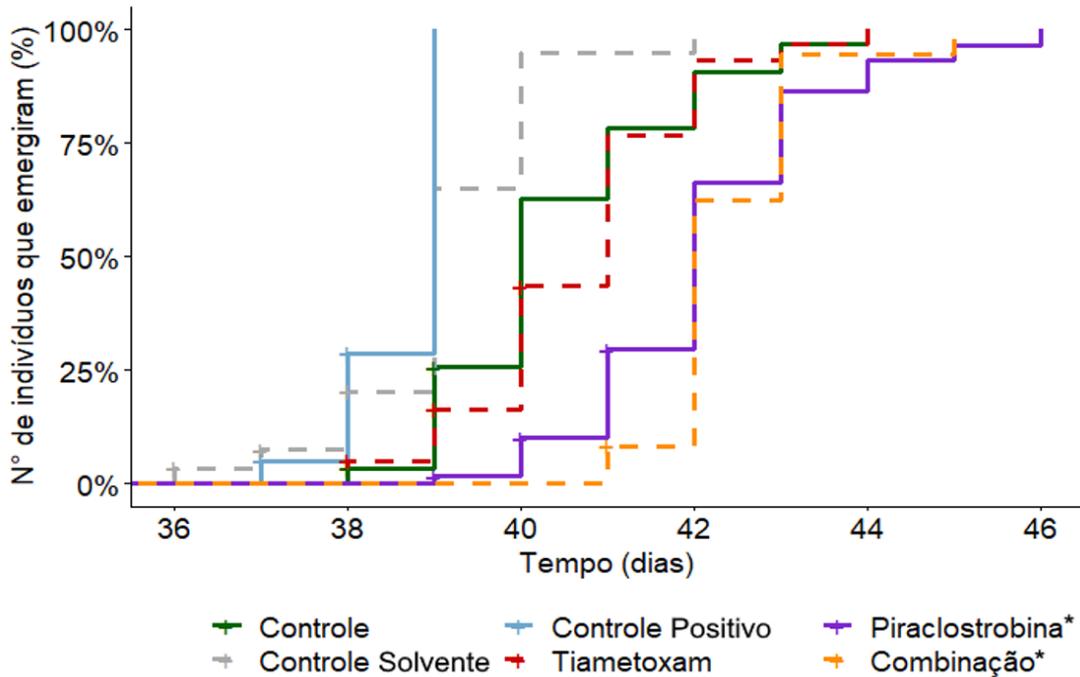
Tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram pupa de olhos marrons. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos expostos e os grupos controle (\* $p < 0,05$ ).

**Figura 10.** Tempo em que os indivíduos de *S. postica* atingiram pupa de olhos pretos.



Tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram pupa de olhos pretos. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos expostos e os grupos controle (\* $p < 0,05$ ).

**Figura 11.** Tempo em que os indivíduos de *S. postica* emergiram.



Tempo (em dias) que os indivíduos (%) emergiram. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os grupos expostos e os grupos controle (\*p < 0,05).

## 5. DISCUSSÃO

O grupo CTL apresentou taxa de mortalidade larval de 20% e os protocolos da OECD para bioensaios de toxicidade, que utilizam *A. mellifera* como modelo, recomendam que a mortalidade dos grupos controle deve ser inferior a 15% (OECD, 2016). Esse resultado pode estar relacionado ao sistema de alimentação observado em abelhas-sem-ferrão, pois o alimento é depositado uma só vez e não há contato com as larvas após a oviposição (GRÜTER, 2020). A abertura das células de cria e manejo no momento da transferência pode ser um fator estressante, gerando mortalidade de algumas larvas nos primeiros dias de alimentação.

Outro fator que pode ter levado a este resultado, foi o período em que o bioensaio foi conduzido, pois, devido às chuvas que ocorreram na época, o experimento foi realizado no início de maio, ao final do outono. Como o inverno é um momento de escassez de recursos e o forrageamento das operárias é reduzido, já havia se iniciado a suplementação alimentar das colônias do meliponário com xarope artificial. As dietas artificiais podem alterar a microbiota do intestino das abelhas (WANG et al., 2020) e, apesar de beneficiar nutricionalmente a colônia (ABOU-SHAARA, 2017), poderia ter modificado a composição do alimento fornecido para as larvas, que necessitam de uma variedade de nutrientes para se desenvolverem, como proteínas e esteróis, obtidos principalmente pelo pólen (BRODSCHNEIDER; CRAILSHEIM, 2010).

Apesar disso, as taxas de mortalidade das larvas observadas nos grupos TMX e PIR foram inferiores a 15% e não diferiram estatisticamente do grupo controle, o que indica que essa diferença não é significativa.

O grupo TMX+PIR apresentou a menor taxa de emergência de pupas quando comparado aos grupos CTL e TMX, mas não diferiu significativamente dos demais. Por sua vez, os grupos TMX e PIR não diferiram do grupo CTL, ou seja, a exposição ao tiametoxam e piraclostrobina isoladamente não interferiu nesse parâmetro.

Quando a exposição combinada apresenta maior toxicidade do que os compostos isolados, pode sugerir que existem efeitos sinérgicos entre os agrotóxicos, mas tais interações são complexas de serem identificadas, uma vez que podem variar de acordo com diferentes concentrações (TOSI et al., 2022). Nesse sentido, Wei et al. (2021) observou que a mistura de imidacloprido e azoxistrobina, um inseticida neonicotinoide e fungicida estrobirulina, tem potencial de apresentar efeitos sinérgicos em baixas concentrações e efeitos antagônicos em altas concentrações para a espécie *Chironomus dilutus* Shobanov, Kiknadze & Butler, 1999 (Diptera: Nematocera).

Estudos com *A. mellifera* na fase larval demonstram que os dois agrotóxicos têm potencial de interferir na emergência das pupas, indicando que a exposição ao tiametoxam (0,001 e 1,44 ng/μL) pode aumentar a mortalidade nessa fase (TAVARES et al., 2017). E a exposição ao piraclostrobina, especialmente em concentrações subletais (entre 0,91 e 0,03 ng/μL), é menos comum de se observar efeitos adversos (DOMINGUES et al., 2021; TADEI et al., 2019), mas concentrações de campo (100 e 83,3 ng/μL) resultaram na diminuição da taxa de emergência das pupas (XIONG et al., 2023).

Interações sinérgicas podem resultar em efeitos maiores do que previstos (MARTIN et al., 2021) e como não foram observadas diferenças significativas para os agrotóxicos isolados, um efeito sinérgico entre o tiametoxam e piraclostrobina pode ter potencializado a mortalidade das pupas. A mortalidade das pupas pode afetar a higiene da colônia, pois a remoção de pupas mortas não é tão eficiente quando a remoção de larvas mortas (GRÜTER, 2020). Ademais, Pettis et al. (2013) constataram que *A. mellifera* expostas a concentrações residuais de piraclostrobina e neonicotinoides são mais suscetíveis a patógenos e, combinado ao comportamento higiênico menos eficiente, pode afetar a saúde da colônia a longo prazo.

Em relação aos tempos de cada fase de desenvolvimento, não foram observadas diferenças significativas no período larval, mas sim no período pupal. O grupo TMX atingiu a fase pupa de olhos brancos antes dos demais grupos e, como essa é a primeira fase após a

pupação, essa situação pode ser decorrente de uma aceleração no período larval, resultando na metamorfose antecipada. Esses dados corroboram com estudos que observaram aceleração no desenvolvimento no período larval das espécies *A. mellifera* e *S. aff. depilis* expostas concentrações subletais do tiametoxam (TAVARES et al., 2015; ROSA et al., 2016). Portanto, a concentração de 0,044 ng i.a./larva demonstrou potencial de acelerar a metamorfose, mesmo que estatisticamente os grupos não tenham apresentado diferenças nos tempos de desenvolvimento.

Na fase pupa de olhos rosas, foi observado um adiantamento do grupo ACE, podendo estar relacionado ao solvente acetona, utilizado para diluir o piraclostrobina. Mas o mesmo não foi observado nos grupos PIR e TMX+PIR, indicando que quaisquer efeitos observados nesses grupos não tiveram relação com a acetona, apenas com os agrotóxicos testados. A concentração final desse solvente no alimento larval oferecido às larvas foi de 0,4% e, portanto, não excedeu o valor de 2% permitido pela OECD nº 239 (2016).

Nas fases pupa de olhos rosas e pupa de olhos pretos foram observados atrasos do grupo TMX+PIR em relação aos demais. Esse resultado corrobora com o estudo de Wu, Anelli e Sheppard (2011), que observaram atraso no desenvolvimento de *A. mellifera* exposta a concentrações residuais de diversos agrotóxicos, dentre eles, tiametoxam e azoxistrobina, um fungicida do grupo das estrobirulinas, como o piraclostrobina, o que poderia impactar negativamente atividades a longo prazo, como limpeza da colônia, cuidados parentais e eficiência do forrageamento.

Na emergência, houve atraso dos grupos PIR e TMX+PIR em relação aos demais, indicando que o piraclostrobina pode ter interferido no tempo de emergência das abelhas, uma vez que o mesmo não foi observado para o grupo TMX.

O modo de ação do piraclostrobina, um fungicida do grupo das estrobirulinas, consiste em impedir o desenvolvimento dos fungos por meio do bloqueio da síntese de ATP (DEVI et al., 2020). A associação do gênero *Scaptotrigona* com *Zygosaccharomyces* sp. tem papel essencial na metamorfose, pois esse fungo acumula ergosterol no citoplasma, um importante precursor para a biossíntese de hormônios ecdisteroides e que não é produzido naturalmente pelos insetos (DE PAULA et al., 2021). A ausência do fungo e, conseqüentemente, de ergosterol no alimento larval impede a metamorfose, mas concentrações mais baixas permitem que ela ocorra, porém, causam atraso no desenvolvimento pupal (PALUDO et al., 2018), corroborando os resultados apresentados.

Portanto, a exposição ao piraclostrobina na concentração de 69,675 ng i.a/larva alterou significativamente o desenvolvimento das pupas e atrasou a emergência de *S. postica*, indicando uma possível interferência desse agrotóxico no desenvolvimento da microbiota presente naturalmente nas células de cria. Isso pode afetar a reposição de indivíduos e impactar atividades como a divisão de tarefas, que muda conforme as abelhas vão envelhecendo, e também no comportamento higiênico, pois as células de cria são utilizadas apenas uma vez e as operárias dependem da emergência das abelhas para fazer a limpeza das células antigas (GRÜTER, 2020).

Estes resultados indicam que a exposição a concentrações subletais do tiametoxam e piraclostrobina, isolados e combinados, provocou efeitos adversos na emergência das pupas e nos tempos em que os indivíduos atingiram determinadas fases durante o desenvolvimento de *S. postica*. Como resíduos destes agrotóxicos são encontrados em culturas visitadas pelas abelhas-sem-ferrão, os dados apresentados fornecem subsídios para que novos testes sejam realizados com diferentes concentrações destes agrotóxicos na fase larval, assim como na fase adulta.

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a exposição a concentrações subletais do tiametoxam e piraclostrobina, isolados e combinados, interferiu nos tempos de desenvolvimento de *S. postica*, enquanto a combinação destes agrotóxicos interferiu na emergência das pupas. Esses dados contribuem para o melhor entendimento dos impactos da exposição aos agrotóxicos no estágio larval e fornecem subsídios para que novos estudos com abelhas-sem-ferrão sejam realizados.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABOU-SHAARA, H. F. Effects of various sugar feeding choices on survival and tolerance of honey bee workers to low temperatures. **Journal of Entomological and Acarological Research**, v. 49, n. 1, 2017.
- 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.
- BARBOSA, W. F. et al. Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 9, p. 2149–2158, 2015.

- BASS, C.; FIELD, L. M. Neonicotinoids. **Current Biology**, v. 28, n. 14, p. R772–R773, 2018.
- BELSKY, J.; JOSHI, N. K. Effects of fungicide and herbicide chemical exposure on *Apis* and *non-Apis* bees in agricultural landscape. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, 2020.
- BLACQUIÈRE, T. et al. Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology Kluwer Academic Publishers**, 2012.
- BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Ernährung und Gesundheit bei Honigbienen. **Apidologie**, v. 41, p. 278-294, 2010.
- BOTINA, L. L. et al. The impact of early-life exposure to three agrochemicals on survival, behavior, and gut microbiota of stingless bees (*Partamona helleri*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 27, p. 70143–70158, 2023.
- CHAM, K. O. et al. Pesticide Exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 36–48, 2019.
- DE PAULA, G. T. et al. Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 41–47, 2021.
- DECOURTYE, A. et al. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 78, n. 2, p. 83–92, 2004a.
- DECOURTYE, A. et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, n. 3, p. 410–419, 2004b.
- DEVI, B. et al. Efficacy of new generation fungicides against French bean rust caused by *Uromyces appendiculatus*. **Phytoparasitica**, v. 48, n. 4, p. 535–543, 2020.
- DOMINGUES, C. E. DA C. 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.
- DOMINGUES, C. E. DA C. et al. Effects of larval exposure to the fungicide pyraclostrobin on the post-embryonic development of Africanized *Apis mellifera* workers. **Environmental Advances**, v. 4, p. 100069, 2021.
- DORIGO, A. S. et al. Biological data of stingless bees with potential application in pesticide risk assessments. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 777–779, 2018.
- DORIGO, A. S. et al. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0213109, 2019.
- EFSA. Revised guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). **EFSA Journal**, v. 21, n. 2023.
- 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.
- FISHER, A. et al. Colony field test reveals dramatically higher toxicity of a widely-used mitotoxic fungicide on honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Pollution**, v. 269, p. 115964, 2021.

GRÜTER, C. **Stingless Bees**. Cham: Springer International Publishing, 2020.

IVERSON, A. et al. Synergistic effects of three sterol biosynthesis inhibiting fungicides on the toxicity of a pyrethroid and neonicotinoid insecticide to bumble bees. **Apidologie**, v. 50, n. 5, p. 733–744, 2019.

KASSAMBARA, A.; KOSINSKI, M.; BIECEK, P. **Survminer: Drawing survival curves using “ggplot2”**. 2021. Disponível em: <https://rpkgs.datanovia.com/survminer/index.html>. Acesso em: 9 ago. 2023

LIMA, M. A. P. et al. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, n. 9–10, p. 733–747, 2016.

LOURENCETTI, A. P. S. et al. Surrogate species in pesticide risk assessments: Toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, p. 120842, 2023.

MARTIN, O. et al. Ten years of research on synergisms and antagonisms in chemical mixtures: A systematic review and quantitative reappraisal of mixture studies. **Environment International**, v. 146, p. 106206, 2021.

MICHENER, C. D. **The bees of the world**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007.

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

OECD. **Guidance document on honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, repeated exposure series on testing and assessment n° 239**. Paris: 2016. Disponível em: [www.oecd.org/chemicalsafety](http://www.oecd.org/chemicalsafety).

PALUDO, C. R. et al. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific Reports**, v. 8, p. 1122, 2018.

PETTIS, J. S. et al. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70182, 2013.

PRADO, F. S. R. DO et al. Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 via oral and topic acute exposure. **Environmental Pollution**, v. 265, 2020.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMETRIO, C. G. B. **Half-Normal Plots with Simulation Envelopes**. HNP Package. 2018.

RORTAIS, A. et al. Modes of honeybees' exposure to systemic insecticides: Estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 71–83, 2005.

ROSA, A. DE S. et al. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona* aff. *depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729–738, 2016.

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.

- SEIDE, V. E. et al. Glyphosate is lethal and Cry toxins alter the development of the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1854–1860, 2018.
- SGOLASTRA, F. et al. Synergistic mortality between a neonicotinoid insecticide and an ergosterol-biosynthesis-inhibiting fungicide in three bee species. **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1236–1243, 2017.
- SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 11, p. 2482–2486, 2001.
- TADEI, R. et al. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 3277, 2019.
- TAVARES, D. A. et al. *In vitro* effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370–378, 2015.
- TAVARES, D. A. et al. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 386–393, 2017.
- THERNEAU, T. M. **A Package for Survival Analysis in R**. New York Springer, 2023. Disponível em: <https://github.com/therneau/survival>. Acesso em: 9 ago. 2023.
- 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**, v. 844, p. 156857, 2022.
- WANG, Hongfang et al. The different dietary sugars modulate the composition of the gut microbiota in honeybee during overwintering. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 2020.
- WEI, F. et al. Joint toxicity of imidacloprid and azoxystrobin to *Chironomus dilutus* at organism, cell, and gene levels. **Aquatic Toxicology**, v. 233, p. 105783, 2021.
- WU, J. Y.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Sub-Lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e14720, 2011.
- XIONG, M. et al. Field recommended concentrations of pyraclostrobin exposure disturb the development and immune response of worker bees (*Apis mellifera* L.) larvae and pupae. **Frontiers in Physiology**, v. 14, 2023.
- ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. D. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- ZHU, W. et al. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e77547, 2014.

## ARTIGO 2

### **Efeitos da exposição ao tiametoxam e piraclostrobina na formação de estruturas sensoriais importantes para o forrageamento de *Scaptotrigona postica***

#### **RESUMO**

As abelhas-sem-ferrão são importantes polinizadores de culturas de alto valor econômico e o serviço de polinização prestado por elas depende diretamente da habilidade de forrageamento, momento em que pode ocorrer o contato com diversos agrotóxicos no campo. Essa atividade está intimamente ligada ao olfato e à visão, pois os órgãos sensoriais associados a estes sistemas, como antenas e olhos, permitem a localização de recursos, orientação e reconhecimento da colônia. Há evidências de que a exposição a concentrações subletais de agrotóxicos pode causar perda de funções olfativas e cognitivas em abelhas adultas e, como a formação das antenas e dos olhos compostos ocorre durante o desenvolvimento larval e pupal, é fundamental que estudos ecotoxicológicos sejam desenvolvidos nessa fase. O objetivo desse trabalho foi avaliar se a exposição das larvas a concentrações subletais do inseticida tiametoxam e do fungicida piraclostrobina, isolados e combinados, afeta a morfologia de estruturas que compõem órgãos do sistema olfativo e visual das abelhas recém-emergidas. Para isso, larvas de *Scaptotrigona postica* foram expostas ao ingrediente ativo destes compostos nas concentrações: 0,044 ng i.a/larva de tiametoxam e 69,675 ng i.a/larva de piraclostrobina. Foram realizadas análises morfológicas e morfométricas para avaliar a formação das sensilas antenais e das facetas oculares, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados indicaram que o tiametoxam pode interferir na formação das sensilas celocônicas e ampuláceas, mas o mesmo não foi observado para o piraclostrobina e para a combinação. Para os demais tipos de sensilas e facetas oculares, não foram observadas alterações nos grupos expostos. Portanto, este estudo concluiu que a exposição ao tiametoxam tem potencial de interferir na formação das sensilas de *S. postica*, mas a exposição ao piraclostrobina não apresentou efeitos adversos.

**Palavras-chave:** abelha sem ferrão, forrageamento, microscopia eletrônica de varredura, sensilas antenais, facetas oculares.

**Effects of thiamethoxam and pyraclostrobin exposure on the formation of sensory structures important for *Scaptotrigona postica* foraging**

**ABSTRACT**

Stingless bees are relevant pollinators of high-value economic crops, and the pollination service they provide depends directly on their foraging ability, a moment when contact with various pesticides in the field can occur. This activity is closely linked to the sense of smell and vision, as the sensory organs associated with these systems, such as antennae and compound eyes, enable resource localization, orientation, and colony recognition. There is evidence that exposure to sublethal concentrations of pesticides can cause loss of olfactory and cognitive functions in adult bees, and the formation of antennae and compound eyes occurs during larval and pupal development, so ecotoxicological studies must be conducted during this phase. Our study aimed to evaluate whether exposure of larvae to sublethal concentrations of the insecticide thiamethoxam and the fungicide pyraclostrobin, both individually and in combination, affects the morphology of the organ structures of the olfactory and visual systems of newly emerged bees. For this purpose, we exposed larvae of *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae) to the active ingredient of these compounds at concentrations of 0.044 ng i.a./larva for thiamethoxam and 69.675 ng/ $\mu$ L for pyraclostrobin. We evaluated the antennae and eyes through morphological and morphometric analyses using scanning electron microscopy (SEM). The results indicated that thiamethoxam could interfere with coeloconic and ampullaceous sensilla formation, but the same did not happen for pyraclostrobin and the combination groups. We observed no changes in the exposed groups for the other types of sensilla and ocular facets. Therefore, our study concluded that exposure to thiamethoxam could interfere with the formation of sensilla in *S. postica*, but exposure to pyraclostrobin did not show adverse effects.

**Keywords:** Stingless bee, foraging, scanning electron microscopy, antennal sensilla, ocular facets.

## 1. INTRODUÇÃO

O importante serviço ecossistêmico de polinização prestado pelas abelhas depende diretamente de sua habilidade de forrageamento, uma vez que essa atividade possibilita o acesso a recursos, como pólen e néctar, que serão utilizados para a manutenção da colônia, desenvolvimento larval e maturação sexual (NICHOLLS; HEMPEL DE IBARRA, 2017). Nesse momento, as abelhas podem entrar em contato com concentrações letais e subletais de diversos agrotóxicos no campo (O'REILLY; STANLEY, 2023). Considerando que as abelhas-sem-ferrão são importantes polinizadores de culturas de alto valor econômico (GIANNINI et al., 2020), se faz necessário entender se a exposição dessas espécies a agrotóxicos pode causar alterações morfológicas em estruturas importantes para o desempenho desse serviço ecossistêmico. Como a formação dos órgãos sensoriais tem início no período larval (BLAIR, 2009), estudos ecotoxicológicos devem ser desenvolvidos nessa fase.

O forrageamento está intimamente ligado ao olfato e à visão, pois os órgãos sensoriais associados a estes sistemas permitem a localização de recursos, orientação e reconhecimento da colônia. As antenas são os principais órgãos olfativos e a detecção de odores ocorre por meio de neurônios receptores, localizados abaixo de estruturas sensoriais chamadas sensilas. Os principais órgãos associados à visão são os olhos compostos, os quais permitem a diferenciação de cores e formas pelas abelhas (CHAKRABARTI et al., 2015; CRUZ-LANDIM, 2009).

A formação das antenas e dos olhos compostos ocorre durante o desenvolvimento larval e pupal. As antenas são formadas pela diferenciação dos discos imaginais e, na fase de pupa, ocorre a formação da cutícula sensorial, onde surgem as sensilas, que se originam a partir de uma célula precursora que surge na superfície epidérmica, diferenciando-se em neurônios e células acessórias (DOHANIK et al., 2016).

De acordo com a espécie, as sensilas variam quanto aos tipos, quantidade e distribuição. Dentro de uma mesma espécie, possuem morfologia distinta, permitindo classificá-las em tricoides, placoides, basicônicas, campaniformes, céticas, celocônicas e ampuláceas. Quanto à função, podem ser sensíveis a CO<sub>2</sub>, mecano-, quimio-, termo- e higrorreceptoras (RAVAIANO et al., 2014).

Sensilas tricoides são pelos presentes por toda a antena, têm função mecano e quimiorreceptora e são observadas em maior abundância, juntamente com as placoides. Sensilas placoides são depressões em formato ovalado, responsáveis pela percepção de odor, também conhecidas como discos olfatórios. Sensilas basicônicas são inseridas em uma

depressão obturada e possuem formato mais arredondado, responsáveis pela percepção volátil e gustatória (CRUZ-LANDIM, 2009; BALBUENA; FARINA, 2020).

Sensilas cétricas são menos inclinadas do que as tricoides e tem extremidade levemente inclinada para sua base, com função quimio- e mecanorreceptora. As sensilas celocônicas e ampuláceas são muito semelhantes entre si, consistem em um orifício na superfície da antena, e a principal diferença entre as duas é o diâmetro, sendo que as celocônicas são maiores do que as ampuláceas. Sensilas campaniformes são depressões bem delimitadas com uma região central proeminente (RAVAIANO et al., 2014). As celocônicas tem função de percepção gustatória e higrorreceptora; as ampuláceas e campaniformes são termo- e higrorreceptoras, mas as ampuláceas também são receptoras de CO<sub>2</sub> (RAVAIANO et al., 2014; BALBUENA; FARINA, 2020).

A formação dos olhos compostos se inicia pela retina, originada a partir de células epiteliais ainda na fase larval, mas só após a metamorfose é que o desenvolvimento completo pode ser observado (ANTONIO, 2008). Os olhos compostos são responsáveis pela visão dos insetos, formados por pequenas unidades denominadas omatídeos cuja superfície externa é composta por lentes córneas. Essas lentes são reunidas lado a lado, formando um arranjo de facetas hexagonais (CHAPMAN, 2013).

Há evidências de que a exposição a concentrações subletais de agrotóxicos pode causar perda de funções relacionadas à aprendizagem olfativa e visual em abelhas adultas (CABIROL; HAASE, 2019; FISCHER et al., 2014; PEREIRA; DINIZ; TAKASUSUKI, 2020). Mudanças nas estruturas sensoriais que compõem órgãos associados a essas funções, como as antenas e olhos, podem ter consequências negativas para as habilidades de forrageamento (CHAKRABARTI; SARKAR; BASU, 2019). Além disso, as abelhas podem trazer alimento contaminado para a colônia, o qual será utilizado para alimentar as próximas gerações (KAUR et al., 2023). Portanto, além da exposição na fase adulta, pode ocorrer a exposição na fase larval por meio da alimentação oferecida nesse período.

O presente estudo tem como objetivo investigar se a exposição oral das larvas a concentrações subletais do inseticida tiametoxam e do fungicida piraclostrobina, isolados e combinados, afeta a morfologia de estruturas presentes em órgãos do sistema olfativo e visual das abelhas recém-emergidas. Foi selecionada a espécie *S. postica* devido à sua importância ecológica na polinização e por ser considerada um modelo representativo para as abelhas nativas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Delineamento experimental

A coleta do material biológico, concentrações obtidas dos agrotóxicos e bioensaios de exposição foram as mesmas descritas no Artigo 1, de acordo com os itens, 2.1.1, 2.1.2 e 2.1.3, respectivamente.

#### 2.1.1 Preparo do material biológico para MEV

Logo após a emergência, as abelhas foram coletadas, levadas ao freezer a -20°C para anestesiá-las e depois serem dissecadas, separando-se a cabeça do corpo (Figura 1A). As estruturas foram acondicionadas em microtubos de centrifugação contendo 1,5 mL de solução fixadora aquosa de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M, Electron Microscopy Sciences, pH 7,4. Posteriormente, foram submetidas a análise morfológica por meio de microscopia eletrônica de varredura.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Caracterização de Materiais (LABMICAM), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos.

Com o auxílio de uma pinça de ponta fina, as amostras foram retiradas dos microtubos de centrifugação contendo as cabeças das abelhas recém-emergidas, sendo selecionadas aleatoriamente cinco cabeças de cada grupo experimental. Estas cabeças foram colocadas em placas de Petri de vidro e levadas ao estereomicroscópio, onde tiveram a antena esquerda removida com um corte rente à base do escapo. Foram analisados cinco antenas e cinco olhos de cada grupo experimental, totalizando 30 antenas e 30 olhos.

A câmara de análise do microscópio eletrônico de varredura tem um porta amostras, onde peças de metal em formato circular chamadas *stubs* são encaixadas; em cima destas peças, as amostras são fixadas com o auxílio de uma fita condutiva de carbono dupla face, colada em sua superfície. Neste momento, as antenas removidas foram fixadas em um *stub* e as cabeças remanescentes foram fixadas em outros dois.

Após o preparo, os *stubs* foram levados por 30 minutos para secar na estufa a 35°C e depois passaram pelo processo de metalização pelo dispositivo de revestimento à vácuo Leica EM ACE200 (Figura 1B), onde uma camada de 20 nm de ouro foi pulverizada sobre as amostras.

Em seguida, foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura Thermo Fisher Scientific Prisma E para caracterização morfológica (Figura 1C) e posteriormente analisadas por meio do *software* ImageJ2.

**Figura 1.** Preparo de *S. postica* para MEV. (A) Cabeças dissecadas. (B) Dispositivo de revestimento à vácuo. (C) *Stubs* com amostras metalizadas inseridas no porta amostras.



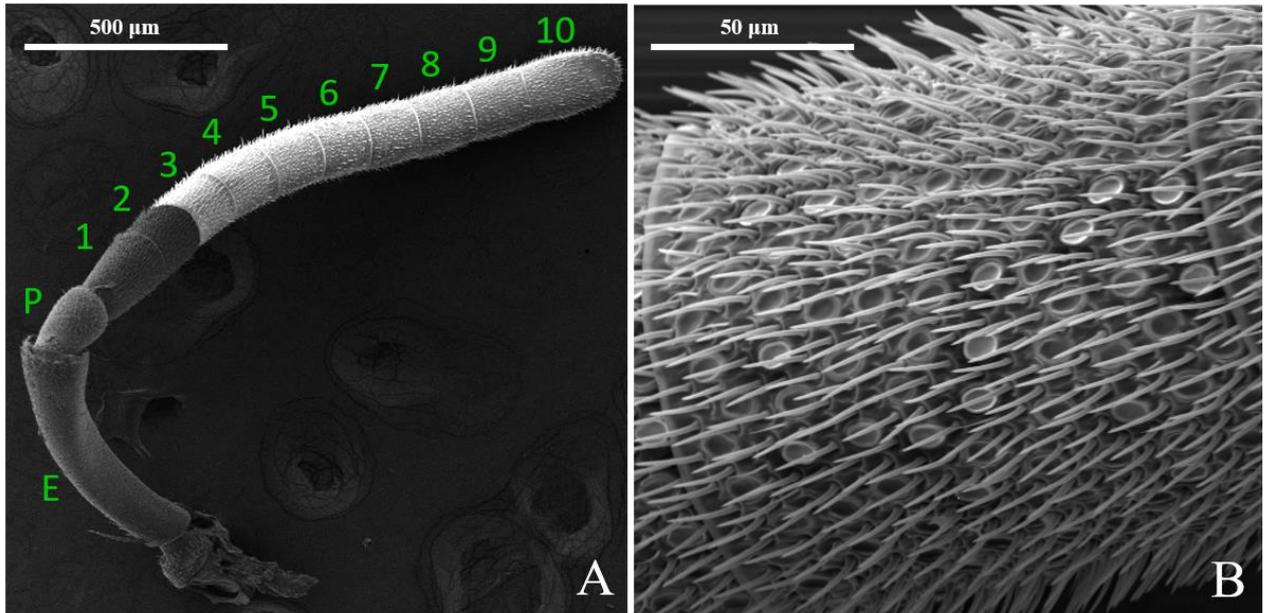
Fonte: Autoria própria, 2023.

### 2.1.2 Análise da superfície das antenas

As antenas das operárias de *S. postica* possuem 10 flagelômeros e sua contagem foi realizada a partir do primeiro adjacente ao pedicelo (região proximal ou basal) até a ponta das antenas (região distal), conforme indicado na Figura 2A. Para caracterizar as antenas, uma imagem do sexto flagelômero, no aumento de 800x, na escala de 50  $\mu\text{m}$ , foi obtida por MEV (Figura 2B). O sexto flagelômero foi escolhido como comparativo devido à sua posição central na antena e porque concentra mais sensilas em comparação aos primeiros flagelômeros, uma vez que o número mais abundante de sensilas em abelhas estão localizados nos oito segmentos distais (CRUZ-LANDIM, 2009). A superfície dorsal da antena concentra as sensilas, portanto, as imagens foram adquiridas nesta região (BALBUENA; FARINA, 2020; CRUZ-LANDIM, 2009).

Posteriormente, as imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ2. Baseado no método de Balbuena e Farina (2020), uma área de 90 x 90  $\mu\text{m}$  foi selecionada por meio da ferramenta “*rectangle*” no centro do flagelômero 6 e as sensilas presentes foram contadas na íntegra com a ferramenta “*multi-point*”.

**Figura 2.** Micrografia eletrônica de varredura da antena de *S. postica*. (A) Antena na ampliação de 90x com flagelômeros enumerados de 1 a 10. P: Pedicelo. E: Escapo. (B) Flagelômero na ampliação de 800x.

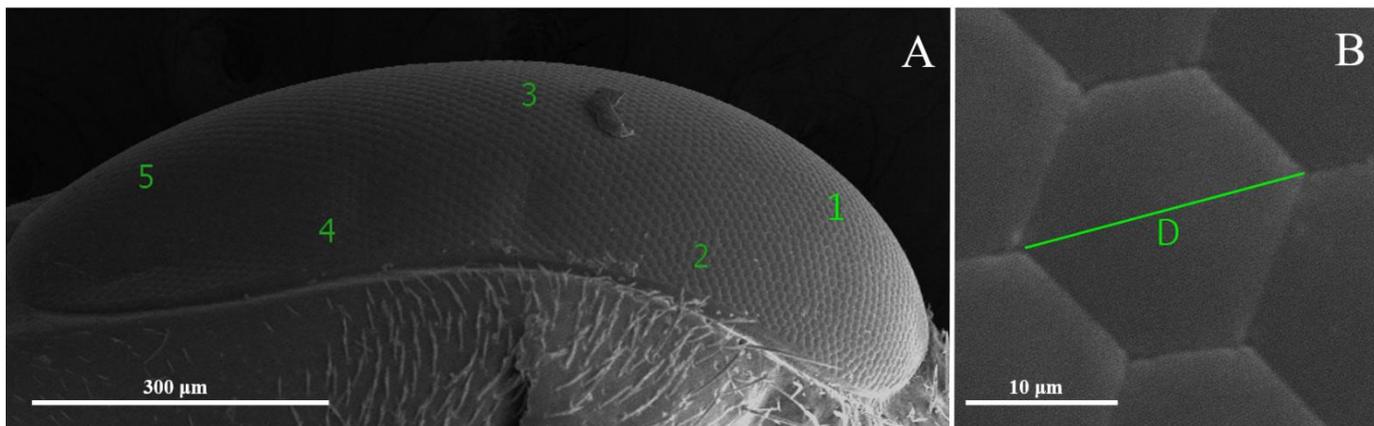


Fonte: Autoria própria, 2023.

### 2.1.3 Análise da superfície dos olhos

Para cada abelha, cinco facetas aleatórias (Figura 3A) do olho direito foram fotografadas por MEV no aumento de 4000x, na escala de 10 µm. Posteriormente, as imagens foram analisadas pelo *software* ImageJ2. Seguindo o método de Chakrabarti, Sarkar e Basu (2019), a diagonal (D) de cada faceta foi medida por meio de uma linha traçada entre os dois vértices centrais (Figura 3B) utilizando-se a ferramenta “*straight*” e o comprimento, em µm, foi obtido.

**Figura 3.** Micrografias eletrônicas de varredura dos olhos de *S. postica*. (A) Olho composto com regiões amostradas enumeradas de 1 a 5. (B) Faceta ocular e diagonal (D) indicada.



Fonte: Autoria própria, 2023.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software RStudio v. 4.2.2 (R Core Team, 2022), utilizando Modelos Lineares Generalizados (GLM), pois os dados não apresentaram normalidade dos resíduos segundo o teste de Shapiro-Wilk. As médias, desvio e erro padrão foram calculados para a quantidade das sensilas tricoides, céticas, placoides, basicônicas e celocônicas/ampuláceas, assim como para o comprimento das facetas oculares.

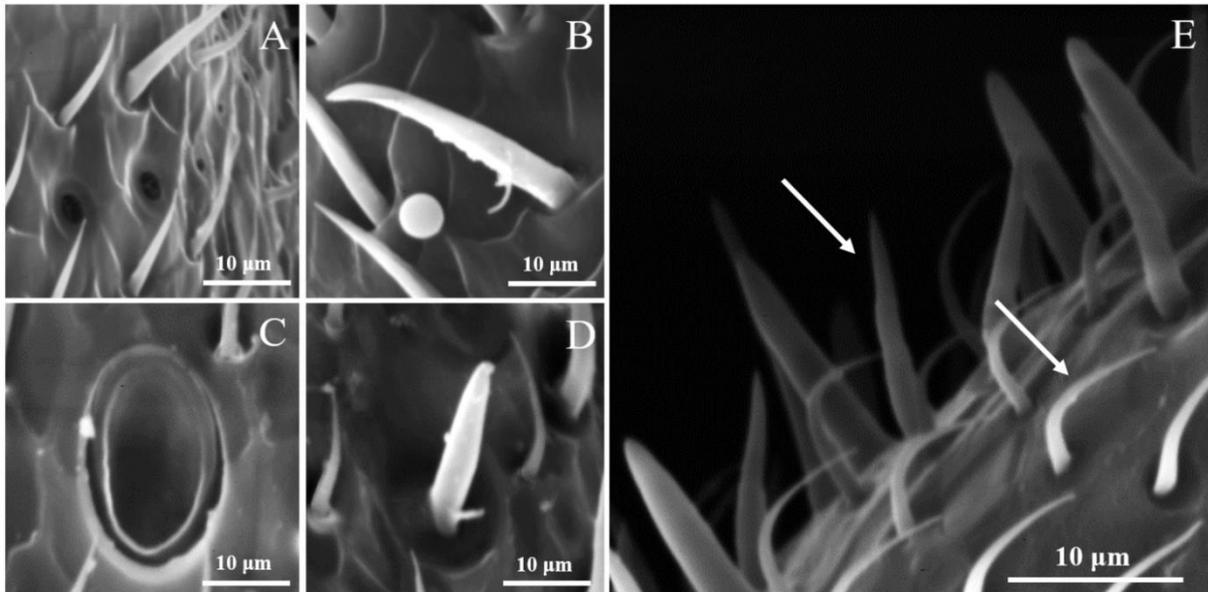
A distribuição que melhor se ajustou ao modelo foi a Poisson para o comprimento das facetas oculares e para a quantidade das sensilas céticas e placoides. Para os demais tipos de sensilas, foi utilizada a distribuição quase-Poisson. A adequação do modelo foi feita pela análise do gráfico de probabilidade normal com envelope simulado, obtido pela função “hnp” (MORAL; HINDE; DEMETRIO, 2018). Após a obtenção dos resultados pelo modelo escolhido, as médias dos grupos foram comparadas pelo pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%.

### 4. RESULTADOS

#### 4.1 Morfologia e sensilas presentes nas antenas

As micrografias obtidas por MEV permitiram a identificação de cinco tipos de sensilas presentes no sexto flagelômero, sendo: celocônicas/ampuláceas (CA), céticas (CE), placoides (SP), basicônicas (SB) e tricoides (ST) (Figura 4).

**Figura 4.** Diferentes tipos de sensilas presentes nas antenas de *S. postica*. (A) Sensilas celocônicas/ampuláceas. (B) Sensila cética. (C) Sensila placoide. (D) Sensila basicônica. (E) Sensilas tricoides (indicadas por seta).



**Fonte:** Autoria própria, 2023.

Os dados apresentados na Tabela 1 indicam que os grupos experimentais demonstraram ser estatisticamente iguais entre si em relação à quantidade das ST, CE, SP e SB, indicando que os grupos expostos possuem a mesma média de sensilas do que os grupos CTL e ACE.

Em relação às CA, os grupos ACE e PIR demonstraram ser estatisticamente iguais entre si. O grupo TMX apresentou a menor média e diferiu estatisticamente dos grupos ACE e PIR. Os grupos CTL, DIM e TMX+PIR demonstraram ser estatisticamente iguais aos demais grupos.

**Tabela 1.** Quantidade de sensilas encontradas nas antenas de *S. postica* (médias  $\pm$  desvio padrão).

Grupos	ST	CE	SP	SB	CA
<b>CTL</b>	41,00 $\pm$ 4,36 a	0,80 $\pm$ 0,84 a	11,80 $\pm$ 4,38 a	2,00 $\pm$ 1,22 a	3,40 $\pm$ 2,40 ab
<b>ACE</b>	46,80 $\pm$ 3,56 a	0,60 $\pm$ 0,89 a	13,00 $\pm$ 3,39 a	1,40 $\pm$ 1,34 a	4,00 $\pm$ 6,08 b
<b>DIM</b>	42,20 $\pm$ 9,83 a	0,60 $\pm$ 0,55 a	8,80 $\pm$ 2,28 a	1,80 $\pm$ 1,48 a	2,00 $\pm$ 1,58 ab
<b>TMX</b>	40,80 $\pm$ 2,95 a	0,40 $\pm$ 0,55 a	12,40 $\pm$ 4,22 a	2,00 $\pm$ 2,34 a	0,80 $\pm$ 1,09 a
<b>PIR</b>	37,80 $\pm$ 5,80 a	0,40 $\pm$ 0,55 a	13,60 $\pm$ 1,52 a	3,00 $\pm$ 1,22 a	4,60 $\pm$ 1,95 b
<b>TMX+PIR</b>	39,20 $\pm$ 5,21 a	1,00 $\pm$ 1,00 a	11,00 $\pm$ 3,24 a	2,20 $\pm$ 1,79 a	1,80 $\pm$ 0,84 ab

CTL: Controle negativo; ACE: Controle solvente - acetona; DIM: Controle Positivo - dimetoato; TMX: Tiametoxam; PIR: Piraclostrobina; TMX+PIR: Combinação.

ST: Sensilas tricoides; CE: Sensilas cétricas; SP: Sensilas placoides; SB: Sensilas basicônicas; CA: Sensilas celocônicas/ampuláceas. As letras iguais na mesma coluna indicam que os grupos não diferem entre si pelo pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%.

#### 4.2 Morfometria das facetas oculares

Os resultados obtidos pelas análises morfométricas das facetas oculares indicaram que o comprimento da diagonal (D) é estatisticamente igual para todos os grupos experimentais, conforme apresentado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Comprimento da diagonal das facetas de *S. postica* (médias  $\pm$  desvio padrão).

Grupos	Média comprimento ( $\mu\text{m}$ )
<b>CTL</b>	18,19 $\pm$ 1,89 a
<b>ACE</b>	18,86 $\pm$ 1,74 a
<b>DIM</b>	18,72 $\pm$ 2,10 a
<b>TMX</b>	19,55 $\pm$ 1,96 a
<b>PIR</b>	19,86 $\pm$ 2,33 a
<b>TMX+PIR</b>	18,99 $\pm$ 1,79 a

CTL: Controle negativo; ACE: Controle solvente - acetona; DIM: Controle Positivo - dimetoato; TMX: Tiametoxam; PIR: Piraclostrobina; TMX+PIR: Combinação.

As letras iguais na mesma coluna indicam que os grupos não diferem entre si pelo pós-teste de Tukey com nível de significância de 5%.

## 5. DISCUSSÃO

As sensilas encontradas nas antenas foram as mesmas descritas por Stort e Barelli (1981) para *S. postica*, com exceção de um tipo chamado sensila campaniforme, que não foi observada no presente estudo, pois está localizada na extremidade do décimo flagelômero. As sensilas mais abundantes observadas pelos autores foram as tricoides e placóides (STORT; BARELLI, 1981), corroborando com os resultados aqui apresentados.

Em relação à quantidade das sensilas CA, os resultados indicam que apenas o tiametoxam interferiu na formação das sensilas CA, uma vez que o piraclostrobina isolado resultou em uma das maiores médias.

A diminuição da quantidade das sensilas celocônicas e ampuláceas pode prejudicar a habilidade de forrageamento das abelhas operárias, pois a percepção gustatória e da umidade as permite perceber variações nas condições meteorológicas, o que as auxilia a encontrarem os melhores locais e fontes de alimento. Por sua vez, a percepção de CO<sub>2</sub> é importante para o monitoramento da quantidade de oxigênio disponível dentro da colônia (BALBUENA; FARINA, 2020; RAVAIANO et al., 2014).

Em um cenário de mudanças climáticas, a percepção da temperatura e umidade pode ser decisiva para a resiliência da espécie (MAEBE et al., 2021). Segundo o Relatório do IPCC (2023), o aumento da temperatura global tem influência direta em episódios extremos, como ondas de calor, chuvas pesadas, seca e ciclones tropicais.

Abelhas eussociais são mais sensíveis a mudanças de temperatura dentro das colmeias, o que as leva a ter um comportamento termorregulatório (QUIGLEY; AMDAM; HARWOOD, 2019). Em situações de extremo calor, as abelhas-sem-ferrão tem a desvantagem de não poder migrar a colônia completa para outro local, uma vez que as rainhas não tem a habilidade de voar (HRNCIR et al., 2019; QUIGLEY; AMDAM; HARWOOD, 2019).

Nesse momento, é importante que mecanismos comportamentais sejam acionados para regular o microclima dentro das colônias (JARIMI; TAPIA-BRITO; RIFF, 2020), como o “*fanning*”, que significa “abanar-se” em tradução literal (KASPAR; COOK; BREED, 2018). As operárias se unem em locais estratégicos do ninho para facilitar o fluxo de ar por meio do batimento das asas e, dessa forma, promovem a regulação da temperatura e CO<sub>2</sub> (GRÜTER, 2020).

Foi observado que as operárias de *S. depilis* iniciam o “*fanning*” quando a temperatura interna da colônia atinge 37°C (HRNCIR et al., 2019) e a temperatura letal (TL) para *S. postica* é 41°C (MACIEIRA; PRONI, 2004), sendo essencial que a percepção seja

eficiente. Como as sensilas celocônicas e ampuláceas estão associadas a neurônios termossensíveis (RUCHTY et al., 2009), a diminuição na quantidade destas sensilas pode reduzir a resposta das abelhas a altas temperaturas, interferindo na recuperação e resiliência da colônia (QUIGLEY; AMDAM; HARWOOD, 2019).

Além da temperatura, alterações climáticas relacionadas ao regime de chuvas se tornarão mais frequentes (CALVIN et al., 2023). Em locais com extensos períodos de seca, como na Caatinga brasileira, espécies de abelhas-sem-ferrão utilizam de suas habilidades de forrageamento para coletar e estocar recursos para manutenção da colônia em momentos de escassez (HRNCIR et al., 2019). Na situação inversa, em períodos de chuvas intensas, a procura de alimentos é dificultada pela umidade excessiva, especialmente das flores, mas também pode resultar na maior umidade dentro da colmeia, sendo necessário que as abelhas façam a regulação para impedir o crescimento de fungos patogênicos (GRÜTER, 2020; NOGUEIRA-NETO, 1997). Portanto, a diminuição das sensilas celocônicas e ampuláceas pode interferir negativamente na percepção da umidade e, conseqüentemente, na manutenção da colônia.

Meikle et al. (2021) demonstraram que a exposição de colônias de *A. mellifera* a diferentes concentrações do neonicotinoide clotianidina resultou em alterações nas concentrações de CO<sub>2</sub> dentro das colônias. Eles observaram que a maior concentração de clotianidina oferecida para as abelhas (20 ppb) resultou em uma concentração 22% mais alta de CO<sub>2</sub> dentro da colônia, o que pode estar relacionado à baixa eficiência na ventilação (MEIKLE et al., 2021). Associado aos resultados obtidos no presente estudo, a menor quantidade de sensilas ampuláceas nas antenas poderia impactar negativamente a percepção de CO<sub>2</sub> e afetar a saúde da colônia, pois é dessa forma que as abelhas avaliam a quantidade de O<sub>2</sub> disponível (KLEINEIDAM et al., 2000).

Para os demais tipos de sensila, os grupos expostos não apresentaram diferenças significativas para os grupos controle, indicando que as concentrações testadas do tiametoxam e piraclostrobina não alteraram a quantidade das ST, CE, SP e SB presentes nas antenas. Esses resultados corroboram com Chakrabarti et al. (2015) que, em seu estudo com *Apis cerana* Fabricius, 1793 (Hymenoptera, Apidae), observaram alterações morfológicas nas sensilas placóides, celocônicas e tricóides em abelhas coletadas diretamente de colônias em áreas de agricultura intensiva, mas não observaram diferenças significativas em relação à quantidade das sensilas.

Além disso, os pesquisadores testaram a exposição das abelhas adultas em laboratório à combinação de três inseticidas (piretroide, organofosforado e organoclorado) e

não observaram alterações nas sensilas. Isso sugere que a exposição na fase larval pode ser mais problemática do que na fase adulta, pois as larvas irão ingerir alimento contaminado trazido para a colônia, o que pode afetar seu desenvolvimento e resultar em deformações das sensilas (CHAKRABARTI et al., 2015). Mesmo que em nosso estudo os grupos não tenham apresentado diferenças significativas em relação à quantidade das sensilas, novos testes são necessários para esclarecer se a exposição ao tiametoxam e piraclostrobina na fase larval pode resultar em deformidades nessas estruturas.

Em relação ao comprimento das facetas oculares, as médias foram estatisticamente iguais para os grupos expostos e grupos controle. Chakrabarti et al. (2019) observaram diferenças significativas em abelhas adultas de *A. cerana* coletadas de colônias em áreas de agricultura intensiva, sugerindo que a exposição a diversos agrotóxicos na fase larval, por meio do alimento contaminado oferecido para as crias, pode reduzir o tamanho das facetas oculares. Porém, para as concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina testadas, não foram observadas alterações.

Apesar de nosso estudo ter observado diferenças significativas na formação de apenas um tipo de sensila, a exposição ao tiametoxam tem potencial de afetar os sistemas visuais e olfativos diretamente pelo cérebro, pois tem como alvo a acetilcolinesterase, que é o principal neurotransmissor associado a centros sensoriais primários: os lobos antenais ligados ao olfato e os lobos ópticos ligados à visão (CABIROL; HAASE, 2019). Mesmo concentrações subletais de neonicotinoides podem interferir em funções cognitivas das abelhas e prejudicar habilidades importantes para a orientação durante o forrageamento, como a memória olfativa e visual (DECOURTYE; DEVILLERS, 2010; FISCHER et al., 2014).

Yang et al. (2012) demonstraram em seu estudo com *A. mellifera* que a exposição das larvas ao imidacloprido, outro inseticida neonicotinoide, em concentrações subletais de 0,04 e 0,4 ng i.a./larva, resultou na diminuição da capacidade olfativa na fase adulta, o que poderia interferir nas habilidades de forrageamento, uma vez que as operárias teriam dificuldade para localizar fontes de alimento e retornar para a colônia. Como nosso estudo utilizou a concentração de 0,044 ng i.a./larva de tiametoxam e trata-se de uma espécie diferente, a condução de testes na fase pós-emergência são necessários para complementar nossos resultados.

Além disso, ensaios laboratoriais observaram que as operárias de *A. mellifera* tem preferência por soluções contendo imidacloprido e tiametoxam, o que pode estar associado ao modo de ação dos neonicotinoides, que atuam nos receptores nicotínicos de acetilcolina

(nAChRs) do cérebro das abelhas (KESSLER et al., 2015). Dessa forma, a exposição ao tiametoxam no campo aumenta a probabilidade da exposição na fase larval, pois devido ao seu comportamento eussocial, as abelhas operárias poderão trazer recursos florais contaminados que serão posteriormente processados e oferecidos para alimentar novas crias (DORIGO et al., 2019).

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que a exposição a concentrações subletais do tiametoxam na fase larval tem potencial de interferir na formação das sensilas celocônicas e ampuláceas, mas o mesmo não foi observado para o piraclostrobina. Para o melhor entendimento sobre os efeitos desses agrotóxicos no sistema olfativo e visual, maiores investigações devem ser realizadas incluindo avaliações da morfologia das sensilas antenais e testes relacionados às habilidades cognitivas das abelhas emergidas.

## **6. CONCLUSÃO**

Este estudo concluiu que a exposição ao tiametoxam pode afetar a formação das sensilas de *S. postica*, mas a exposição ao piraclostrobina não apresentou efeitos adversos. Por sua vez, o tamanho das facetas oculares não foi afetado pela exposição ao tiametoxam e piraclostrobina, isolados ou combinados. Tais evidências esclarecem os questionamentos levantados pelo presente estudo, de que a exposição a estes agrotóxicos em concentrações subletais na fase larval poderia interferir na formação de estruturas sensoriais importantes para o forrageamento, e contribuem com informações para direcionar novos estudos com abelhas-sem-ferrão.

## 7. REFERÊNCIAS

- ANTONIO, D. S. M. **Processos celulares no desenvolvimento do olho composto de *Apis mellifera***. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- BALBUENA, M. S.; FARINA, W. M. Chemosensory reception in the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Journal of Insect Physiology**, v. 125, p. 104076, 2020.
- BLAIR, S. S. **Encyclopedia of Insects**. Elsevier, 2009.
- CABIROL, A.; HAASE, A. The neurophysiological bases of the impact of neonicotinoid pesticides on the behaviour of honeybees. **Insects**, v. 10, n. 10, p. 344, 2019.
- CALVIN, K. et al. **IPCC, 2023: Climate Change 2023: Synthesis Report**. Contribution of working groups I, II and III to the sixth assessment report of the intergovernmental panel on climate change [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland. 2023.
- CHAKRABARTI, P. et al. Field populations of native Indian honey bees from pesticide intensive agricultural landscape show signs of impaired olfaction. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12504, 2015.
- CHAKRABARTI, P.; SARKAR, S.; BASU, P. Pesticide induced visual abnormalities in Asian honey bees (*Apis cerana* L.) in intensive agricultural landscapes. **Chemosphere**, v. 230, p. 51–58, 2019.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5th. ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 2013.
- CRUZ-LANDIM, C. DA. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009.
- DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J. Insect nicotinic acetylcholine receptors. New York, NY: **Springer New York**, 2010. v. 683.
- DOHANIK, V. T. et al. Development of antennal sensilla of *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Meliponini) during pupation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 2, p. 284–288, 2016.
- DORIGO, A. S. et al. Biological data of stingless bees with potential application in pesticide risk assessments. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 777–779, 2018.
- DORIGO, A. S. et al. *In vitro* larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0213109, 2019.
- FISCHER, J. et al. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91364, 2014.
- 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.
- GRÜTER, C. **Stingless Bees**. Cham: Springer International Publishing, 2020.
- HRNCIR, M. et al. Stingless bees and their adaptations to extreme environments. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 205, n. 3, p. 415–426, 2019.
- JARIMI, H.; TAPIA-BRITO, E.; RIFF, S. A review on thermoregulation techniques in honey bees' (*Apis mellifera*) beehive microclimate and its similarities to the heating and cooling management in buildings. **Future Cities and Environment**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2020.
- KASPAR, R. E.; COOK, C. N.; BREED, M. D. Experienced individuals influence the thermoregulatory fanning behaviour in honey bee colonies. **Animal Behaviour**, v. 142, p. 69–76, 2018.
- KAUR, G. et al. Effect of fungicidal contamination on survival, morphology, and cellular immunity of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Frontiers in Physiology**, v. 14, 2023.
- KESSLER, S. C. et al. Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 74–76, 2015.

KLEINEIDAM, C. et al. Ultrastructure and physiology of the CO<sub>2</sub> sensitive sensillum ampullaceum in the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Arthropod Structure & Development**, v. 29, n. 1, p. 43–55, 2000.

MAEBE, K. et al. Bumblebee resilience to climate change, through plastic and adaptive responses. **Global Change Biology**, v. 27, n. 18, p. 4223–4237, 2021.

MEIKLE, W. G. et al. Sublethal concentrations of clothianidin affect honey bee colony growth and hive CO<sub>2</sub> concentration. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 4364, 2021.

NICHOLLS, E.; HEMPEL DE IBARRA, N. Assessment of pollen rewards by foraging bees. **Functional Ecology Blackwell Publishing Ltd**, 2017.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.

OECD. **Guidance Document on Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Repeated Exposure Series on Testing and Assessment No. 239**. Paris: 2016. Disponível em: [www.oecd.org/chemicalsafety](http://www.oecd.org/chemicalsafety).

O'REILLY, A. D.; STANLEY, D. A. Non-neonicotinoid pesticides impact bumblebee activity and pollen provisioning. **Journal of Applied Ecology**, 2023.

PEREIRA, N. C.; DINIZ, T. O.; TAKASUSUKI, M. C. C. R. Sublethal effects of neonicotinoids in bees: a review. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, n. 7, p. 142, 2020.

PETTIS, J. S. et al. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70182, 2013.

QUIGLEY, T. P.; AMDAM, G. V.; HARWOOD, G. H. Honey bees as bioindicators of changing global agricultural landscapes. **Current opinion in insect science**, v. 35, p. 132–137, 2019.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMETRIO, C. G. B. **Half-normal plots with simulation envelopes**. HNP Package, 2018.

RAVAIANO, S. V. et al. The antennal sensilla of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a study of different sexes and castes. **Naturwissenschaften**, v. 101, n. 8, p. 603–611, 2014.

ROSA, A. DE S. et al. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona* aff. *depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729–738, 2016.

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.

RUCHTY, M. et al. The thermo-sensitive sensilla coeloconica of leaf-cutting ants (*Atta vollenweideri*). **Arthropod Structure & Development**, v. 38, n. 3, p. 195–205, 2009.

STORT, A. C.; BARELLI, N. Antennal sensory structures of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 54, n. 4, p. 751, 1981.

YANG, E.-C. et al. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49472, 2012.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo avaliar se a exposição a concentrações subletais de tiametoxam e piraclostrobina, isolados e combinados, afeta o desenvolvimento pós-embrionário e a formação de órgãos sensoriais importantes para orientação e forrageamento de *S. postica*.

Em relação ao desenvolvimento pós-embrionário, os resultados indicaram que a combinação entre o tiametoxam e piraclostrobina diminuiu a taxa de emergência das pupas, o que não foi observado para os demais grupos, indicando que existem possibilidades de efeitos sinérgicos entre os agrotóxicos.

Os tempos de desenvolvimento não apresentaram diferenças para o período larval, mas apresentaram para as fases de pupa. O tiametoxam promoveu adiantamento na fase de pupa de olhos brancos, o que pode ser resultado de uma aceleração do desenvolvimento larval. Enquanto a combinação resultou no atraso das fases de pupa de olhos rosas e pupa de olhos pretos, indicando que a interação entre os agrotóxicos levou a esse resultado, uma vez que esse atraso não foi observado isoladamente.

Na emergência, os grupos expostos ao piraclostrobina e à combinação apresentaram atraso em relação aos demais, sugerindo que esse fungicida interfere na microbiota associada à espécie, afetando a metamorfose e, conseqüentemente, causando atraso na emergência das abelhas.

Em relação à formação das estruturas que compõem os órgãos sensoriais, os resultados indicaram que concentrações subletais do tiametoxam podem interferir na formação das sensilas celocônicas e ampuláceas, mas o mesmo não foi observado para o piraclostrobina e para a combinação. Para os demais tipos de sensilas avaliados e para as facetas oculares, não foram observadas diferenças significativas para os grupos expostos.

Portanto, o presente estudo concluiu que a exposição ao tiametoxam e piraclostrobina em concentrações subletais, tanto isoladamente como em combinação, interferiu nos tempos de desenvolvimento e na emergência de *S. postica*. Contudo, apenas a exposição ao tiametoxam interferiu na formação das sensilas presentes nas antenas, indicando maior potencial de afetar o sistema olfativo.

Esses dados contribuem para o preenchimento das lacunas de conhecimento acerca das espécies nativas e fornecem subsídios para que novos estudos sejam conduzidos para diferentes estágios de desenvolvimento e para outras espécies de abelhas-sem-ferrão.