

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

**EFEITOS LETAIS NA SOBREVIVÊNCIA DE  
ABELHAS SEM FERRÃO *TETRAGONISCA  
ANGUSTULA* (LATREILLE, 1811),  
*CEPHALOTRIGONA CAPITATA* (SMITH, 1854) E  
*TRIGONA SPINIPES*  
(FABRICIUS, 1793) AO DIMETOATO**

**RAÍSSA DOS SANTOS SÁ**

UFES/ES  
DEZEMBRO/2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO

**EFEITOS LETAIS NA SOBREVIVÊNCIA DE  
ABELHAS SEM FERRÃO *TETRAGONISCA  
ANGUSTULA* (LATREILLE, 1811),  
*CEPHALOTRIGONA CAPITATA* (SMITH, 1854) E  
*TRIGONA SPINIPES*  
(FABRICIUS, 1793) AO DIMETOATO**

**RAÍSSA DOS SANTOS SÁ**

Monografia de conclusão de curso apresentada  
ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Espírito Santo, como requisito parcial  
para obtenção do título de BACHAREL EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.

**Orientadora:** Lorena Lisbetd Botina Jojoa  
**Coorientador:** Vander Calmon Tosta

**UFES/ES  
DEZEMBRO/2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: **Raíssa dos Santos Sá**

Título:

**EFEITOS LETAIS NA SOBREVIVÊNCIA DE ABELHAS SEM FERRÃO  
*TETRAGONISCA ANGUSTULA* (LATREILLE, 1811),  
*CEPHALOTRIGONA CAPITATA* (SMITH, 1854) E *TRIGONA SPINIPES*  
(FABRICIUS, 1793) AO DIMETOATO**

Monografia do Curso de Ciências Biológicas (Bacharelado)  
Defendida e aprovada em  07 / 12 / 2023

Com nota 8 pela comissão julgadora:

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LORENA LISBETD BOTINA JOJOA  
Data: 13/12/2023 17:03:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador(a) e presidente da Comissão Examinadora  
Dr(a). Lorena Lisbetd Botina Jojoa (Universidade Federal de Viçosa)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** JULIANA CASTRO MONTEIRO PIROVANI  
Data: 15/12/2023 10:41:33-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador 1

Prof(a). Dr(a). Juliana Castro Monteiro Pirovani (Universidade Federal do Espírito Santo)

Examinador 2

Prof(a). Dr(a). Karina Schimidt Furieri (Universidade Federal do Espírito Santo)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
CENTRO U

Documento assinado digitalmente

ITO SANTO



VANDER CALMON TOSTA

Data: 14/12/2023 10:55:53-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientador

Prof(a). Dr(a). Vander Calmon Tosta (Universidade Federal do Espírito Santo)



**Centro Universitário Norte do Espírito Santo**

Rodovia BR 101 Norte, Km. 60, Bairro Litorâneo, CEP 29932-540

São Mateus - ES

Sítio eletrônico: <http://www.ceunes.ufes.br>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
KARINA SCHMIDT FURIERI - SIAPE 2046079  
Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas - DCAB/CEUNES  
Em 15/12/2023 às 10:47

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/857109?tipoArquivo=O>

Dedico a minha mãe que sempre me apoiou.  
As minhas irmãs Adriana e Cristina que são a  
minha inspiração. E a Mariana por nunca duvidar  
do meu potencial.

“A opinião de alguém sobre você não precisa se tornar sua realidade”.

Les Brown

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por me apoiar e dar suporte para eu seguir o meu caminho.

A minhas irmãs Adriana e Cristina, por serem minha base. Mulheres fortes e exemplos de profissionais que me motivam a continuar a busca pelos meus objetivos.

Aos meus colegas do LABELHAS, em especial a Maria Eduarda de Oliveira, minha amiga e irmã. Percorreremos um longo caminho juntas. Foram muitas risadas, brincadeiras, horas de conversas sobre o futuro, muitas lágrimas, e batalhas que enfrentamos juntas. Você foi essencial na minha jornada, obrigada!

As meninas do laboratório: A Leticia por toda sua simplicidade e disposição em ajudar, a Júlia com toda sua gentileza e tranquilidade em levar a vida, e a Tatiele por todas as risadas, focas que tornaram os dias mais leves.

Ao meu coorientador Vander Calmon Tosta, por todo suporte e apoio para que eu atingisse os meus objetivos diante de qualquer obstáculo.

A minha orientadora Lorena Lisbetd Botina Jojoa, pela paciência e rede de apoio durante todo o processo de construção do meu trabalho. E a Andreza Ribas pela gentileza, ensinamentos e amparo na minha ida a Viçosa.

A Ayrton Ganem pelas horas de ensinamento, demonstrando gentileza, companheirismo, amizade, e principalmente paciência.

A Mariana Sá, a minha pessoa favorita nesse mundo. Obrigada por depositar tanta confiança em mim!

E a minha família e amigos, pois sem o apoio e a ajuda, não seria possível chegar até aqui.

## RESUMO

As abelhas desempenham um papel crucial como polinizadores, e as abelhas sem ferrão destacam-se como um grupo diversificado desse importante serviço ecossistêmico nas regiões neotropicais. No entanto, apesar de sua relevância, essas abelhas têm sido negligenciadas em meio ao declínio alarmante das colônias. Uma das principais causas associadas a esse declínio é a aplicação excessiva e inadequada de pesticidas, representando uma ameaça significativa para o sucesso das colônias de abelhas nativas quando expostas a esses compostos químicos. No contexto brasileiro, o inseticida dimetoato é amplamente utilizado em diversas culturas, expondo as abelhas sem ferrão a riscos consideráveis. No entanto, é preocupante a escassez de estudos que investiguem os efeitos específicos desse pesticida sobre essas abelhas nativas. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos letais na sobrevivência ocasionados pelo inseticida dimetoato, buscando estimar a  $DL_{50}$  para três espécies diferentes de abelhas sem ferrão. Essa avaliação foi conduzida por meio da exposição aguda oral para *Cephalotrigona capitata* e *Tetragonisca angustula*, enquanto a exposição por contato foi realizada para *Cephalotrigona capitata* e *Trigona spinipes*. A análise da sobrevivência das abelhas foi conduzida ao longo de um intervalo de 96 horas, durante o qual as abelhas foram expostas a diferentes doses do inseticida. Para a exposição oral, o alimento contaminado foi fornecido por um período de 6 horas, enquanto para a exposição por contato, uma solução de dimetoato foi aplicada na parte dorsal do tórax das abelhas. As doses letais médias ( $DL_{50}$ ) em 24 horas foram determinadas seguindo os protocolos estabelecidos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para ambas as modalidades de exposição. Foi utilizado uma análise probit para estimar de dose  $DL_{50}$  dos dados de dose - mortalidade. As curvas de sobrevivência determinaram uma diferença significativa entre os tratamentos em cada bioensaio para cada espécie de abelhas sem ferrão. Assim, é possível observar o impacto negativo do dimetoato sobre a taxa de sobrevivência, onde a maior dose teve uma redução significativa na sobrevivência *Cephalotrigona capitata* ( $\chi^2=148$ , 5df,  $p<0,001$ ) e ( $\chi^2=144$ , 5df,  $p<0,001$ ). Assim como na exposição por contato onde *Cephalotrigona capitata* ( $y=182$ , 6df,  $p<0,001$ ) e ( $y=135$ , 5df,  $p<0,001$ ) teve uma redução significativo da sobrevivência. *C. capitata* teve um efeito drástico na taxa de sobrevivência via exposição aguda oral, que já nas primeiras 24h teve menos do 25% de probabilidade na sobrevivência para os indivíduos. A  $DL_{50}$  do dimetoato via exposição oral para *Tetragonisca angustula* foi de 0.00356  $\mu\text{g}$  i.a./abelha e a  $DL_{50}$  do dimetoato via exposição contato para *Cephalotrigona capitata* foi de 0.05058  $\mu\text{g}$  i.a./abelha e *T. spinipes* foi de 0.02936  $\mu\text{g}$  i.a./abelha. Os resultados indicam que quanto maior a dose inseticida, menor a probabilidade de sobrevivência. Este estudo agrega com mais informações e dados sobre impacto dos inseticidas em abelha nativas, contribuindo para a elaboração de medidas e estratégias de conservação das espécies estudadas.

**Palavras-chaves:** declínio de abelhas nativas, inseticidas, avaliação toxicológica, agrotóxicos, dose letal mediana.

## ABSTRACT

Bees play a crucial role as pollinators, and stingless bees stand out as a diverse group in this vital ecosystem service in Neotropical regions. However, despite their importance, these bees have been neglected amidst the alarming decline of colonies. One of the main causes of this decline is the excessive and inappropriate application of pesticides, posing a significant threat to the success of native bee colonies when exposed to these chemicals. In the Brazilian context, the insecticide dimethoate is widely used across various crops, exposing stingless bees to considerable risks. The scarcity of studies investigating the specific effects of this pesticide on these native bees is concerning. Therefore, the aim of this study was to evaluate the lethal effects on survival caused by dimethoate, attempting to estimate the LD50 for three different species of stingless bees. This assessment was conducted through acute oral exposure for *Cephalotrigona capitata* and *Tetragonisca angustula*, and contact exposure for *Cephalotrigona capitata* and *Trigona spinipes*. The analysis of bee survival was carried out over a 96-hour interval, during which the bees were exposed to different doses of the insecticide. For oral exposure, contaminated food was provided for a period of 6 hours, while for contact exposure, a dimethoate solution was applied to the dorsal part of the bees' thorax. The median lethal doses (LD50) in 24 hours were determined following protocols established by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) for both exposure methods. A probit analysis was used to estimate the LD50 dose from dose-mortality data. The survival curves showed a significant difference between treatments in each bioassay for each species of stingless bee. Thus, the negative impact of dimethoate on survival rate is evident, where the higher dose significantly reduced the survival of *Cephalotrigona capitata* ( $\chi^2=148$ , 5df,  $p<0.001$ ) and ( $\chi^2=144$ , 5df,  $p<0.001$ ). Similar results were observed in contact exposure, where *Cephalotrigona capitata* ( $y=182$ , 6df,  $p<0.001$ ) and ( $y=135$ , 5df,  $p<0.001$ ) experienced a significant reduction in survival. *C. capitata* had a drastic effect on survival rate via acute oral exposure, with less than 25% survival probability for individuals in the first 24 hours. The LD50 of dimethoate via oral exposure for *Tetragonisca angustula* was 0.00356  $\mu\text{g a.i./bee}$ , and via contact exposure for *Cephalotrigona capitata* was 0.05058  $\mu\text{g a.i./bee}$ , and for *Trigona spinipes* was 0.02936  $\mu\text{g a.i./bee}$ . The results indicate that the higher the dose of insecticide, the lower the probability of survival. This study provides more information and data on the impact of insecticides on native bees, contributing to the development of conservation measures and strategies for the species studied.

**Keywords:** decline of native bees, insecticides, toxicological assessment, agrochemicals, median lethal dose.

## SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	11
2. <u>OBJETIVOS</u>	16
2.1 <u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	16
3. <u>HIPÓTESE</u>	17
4. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	18
4.1. <u>ABELHAS</u>	18
4.2. <u>BIOENSAIOS DE TOXICIDADE</u>	19
4.2.1. <u>EXPOSIÇÃO ORAL</u>	21
4.2.2. <u>EXPOSIÇÃO POR CONTATO</u>	22
4.3. <u>ANÁLISE ESTATÍSTICA</u>	22
5. <u>RESULTADOS</u>	23
5.1 <u>CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE EXPOSIÇÃO ORAL</u>	22
5.2 <u>CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE EXPOSIÇÃO POR CONTATO</u>	25
6. <u>DISCUSSÃO</u>	27
7. <u>CONCLUSÃO</u>	30
8. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	31

## SUMÁRIO DE FIGURAS

- [Figura 1](#): *Trigona spinipes*, *Cephalotrigona capitata*, *Tetragonisca angustula* .....15
- [Figura 2](#): Curvas de sobrevivência de abelhas forrageiras *Cephalotrigona capitata* expostas por via oral a diferentes doses do inseticida dimetoato (mg ia/abelha) .....20
- [Figura 3](#): Curvas de sobrevivência de abelhas forrageiras *Tetragonisca angustula* expostas por via oral a diferentes doses do inseticida dimetoato (mg ia/abelha) ..... 21
- [Figura 4](#): Curvas de sobrevivência de abelhas forrageiras *Cephalotrigona capitata* expostas por contato a diferentes doses do inseticida dimetoato (mg ia/abelha) ..... 22
- [Figura 5](#): Curvas de sobrevivência de abelhas forrageiras *Trigona spinipes* expostas por contato a diferentes doses do inseticida dimetoato (mg ia/abelha) .....23

## SUMÁRIO DE TABELA

- [Tabela 1](#): Características gerais das 3 espécies de abelhas sem ferrão expostas ao dimetoato.....19
- [Tabela 2](#): Concentrações diluídas de dimetoato para exposição oral das espécies *Cephalotrigona capitata* (Smith, 1854) e *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) .....20
- [Tabela 3](#): Concentrações diluídas de dimetoato para exposição por contato das espécies *Cephalotrigona capitata* (Smith, 1854) e *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793) .....21

## 1.INTRODUÇÃO

Os polinizadores exercem um serviço ecossistêmico imprescindíveis para áreas agrícolas e naturais (Potts et al. 2010), isto porque a polinização garante a manutenção e diversidade genética das plantas com flores que, por sua vez, sustentam a base da biodiversidade e as funções ecossistêmicas (Wolowski et al. 2019). É notável que a contribuição dos polinizadores varia geograficamente, alcançando seu ponto máximo nas zonas tropicais, onde até 94% da polinização de plantas, por animais, é essencial para o sucesso reprodutivo das espécies vegetais, já nas zonas temperadas, esse valor atinge 78% (Ollerton et al. 2011).

Na agricultura, a polinização desempenha um papel crucial ao assegurar a disponibilidade e diversidade de sementes e frutos. Esse processo não apenas contribui de forma significativa para o desenvolvimento robusto das culturas, resultando em colheitas mais abundantes e variadas, mas também revela uma interdependência vital entre plantas e polinizadores, especialmente em espécies que não realizam autopolinização (Wolowski et al. 2019). É digno de nota que o serviço de polinização abrange cerca de 70% das principais culturas consumidas globalmente pelos humanos (Klein et al. 2007). Essa contribuição não é apenas agronomicamente relevante, mas também possui uma dimensão econômica significativa, representando aproximadamente 9,5% do valor da produção agrícola mundial em termos globais. Esse serviço ecossistêmico foi avaliado em € 153 bilhões (Gallai et al. 2009).

As abelhas ocupam uma posição de destaque entre os grupos de animais polinizadores, este grupo diversificado de polinizadores compreende cerca de 20.000 espécies de abelhas distribuídas globalmente, desempenhando um papel fundamental como polinizadores obrigatórios em ecossistemas florais (Ascher et al. 2023). A dieta das abelhas é predominantemente composta por recursos florais, estabelecendo ao longo da evolução uma relação íntima com as angiospermas. Esses recursos florais desempenham papéis multifacetados, servindo não apenas como fonte de alimento, mas também como matéria-prima essencial para a criação de células, construção de ninhos e o processo reprodutivo das abelhas (Pinheiro et al. 2014).

O Brasil destaca-se por abrigar um número expressivo de polinizadores, e as abelhas assumem uma posição proeminente entre esses grupos animais. Elas representam aproximadamente 48% do total de espécies que visitam flores produtoras de alimento no país (Wolowski et al. 2019). Dentro da variedade de abelhas nativas, encontram-se as abelhas sem ferrão, também conhecidas como meliponíneos (Apidae, Hymenoptera) (Ramalho, 2004), e a abelha exótica *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758, Hymenoptera: Apidae) (Wolowski et al. 2019), ambas classificadas como insetos eussociais (Cortopassi-Laurino et al. 2006). Esses grupos de

abelhas desempenham um papel fundamental como principais polinizadores de cultivos relacionados à produção de alimentos (Wolowski et al. 2019). Contudo, é relevante destacar que diversos cultivos dependem da polinização realizada por espécies específicas de abelhas, sendo este serviço, muitas vezes, prestado por abelhas solitárias (Wolowski et al. 2019). Essa complexa rede de interações entre diferentes grupos de abelhas e culturas agrícolas destaca a importância da preservação da biodiversidade desses polinizadores para a sustentabilidade e segurança alimentar no Brasil.

As abelhas sem ferrão são encontradas em uma ampla distribuição nas regiões tropicais, abrangendo quase toda a América Latina e África, assim como o sudeste asiático e o norte da Austrália. No entanto, é na região neotropical que a diversidade desse grupo se destaca, com aproximadamente 600 espécies recentemente catalogadas, das quais 244 são registradas no Brasil (Roubik 2023). Entre as espécies presentes, destacam-se *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) (jataí), *Melipona quadrifasciata* Latreille, 1836 (mandacaia), *Melipona subnitida* Ducke, 1910 (jandaíra), *Melipona scutellaris* Latreille 1811 (uruçu nordestina), *Melipona fasciculata* Smith, 1854 (tiúba), *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (mandacaia amarela), *Melipona flavolineata* Friese, 1900 (uruçu vermelha), *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836 (uruçu amarela), *Plebeia sp.* Schwarz, 1938 (mirim) e *Scaptotrigona sp.* Moure, 1942 (canudo) utilizadas na meliponicultura (Jaffé et al. 2015).

Os meliponíneos estão distribuídos em duas tribos: Meliponini e Trigonini. Os Meliponini não constroem células reais, não havendo distinção das células de cria das rainhas, operárias e machos, diferente da Trigonini que quase sempre criam células reais maiores que as demais, de onde nascem as futuras rainhas (Nogueira Neto, 1997). As colônias de abelhas sem ferrão são compostas pela rainha, operárias e os machos. Onde a rainha realiza a postura dos ovos, e cuida da organização da colônia, comandado por um sistema de comunicação utilizando-se de feromônios. As operárias podem ser facilmente reconhecidas pela presença da corbícula (formada por uma depressão na tíbia envolvida por cerdas que ajudam na coleta do pólen e de outros materiais) presente no terceiro par de pernas. As operárias defendem a colônia e a rainha, manipulam os materiais para construção da colônia, cuidam das células de crias, cuidam da higiene para evitar doenças, coletam e processam o alimento, representando 80% dos indivíduos da colônia. Enquanto os machos são reprodutores e vivem para acasalar rainhas virgens, mas podem realizar pequenos trabalhos, como a desidratação de néctar e a manipulação de cera (Villas, 2012; Oliveira et al. 2013).

No Brasil, o manejo das abelhas nativas sem ferrão, fundamentais para a polinização, ainda está em estágio inicial. Entre as 16 espécies nativas polinizadoras que são manejadas, há relatos de sua contribuição para a produção de 13 diferentes cultivos (Wolowski et al. 2019).

Similar aos serviços de polinização fornecidos pela abelha *Apis mellifera*, as abelhas sem ferrão também desempenham esse papel, e seu valor econômico é otimizado quando são gerenciadas para polinizar comercialmente culturas agrícolas (Kremen et al. 2002) ou criadas de forma racional (Slaa et al. 2006). Esse grupo diversificado de abelhas visita cerca de 144 plantas utilizadas na produção de alimentos no Brasil (Wolowski et al. 2019). Destaca-se que o uso eficiente de *Melipona quadrifasciata* no cultivo de tomates em estufas no Brasil foi observado, aproveitando suas características sociais, baixa agressividade devido ao ferrão atrofiado, alcance limitado para o voo de forrageio e colônias perenes, conferindo maior eficiência na polinização de cultivos comerciais (Cruz et al. 2009). Essas descobertas ressaltam o potencial das abelhas sem ferrão como agentes valiosos na promoção da sustentabilidade e produtividade na agricultura brasileira.

É evidente o papel ecológico das abelhas sem ferrão na polinização de diversas plantas selvagens, sendo uma alternativa viável para a polinização comercial. No entanto, assim como a abelha *A. mellifera*, esse grupo de abelhas enfrenta um declínio alarmante das colônias atualmente (Slaa et al. 2006; Potts, 2010; Breeze et al. 2014). Esse declínio é frequentemente associado a fatores como interferência antropogênica, intensificação agrícola, mudanças climáticas, agentes patogênicos, interações e o uso de pesticidas (Van Bergen e The Insect Pollinators Initiative, 2013). A urgência de abordar esses desafios torna-se evidente, destacando a necessidade premente de estratégias de conservação e adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis para preservar esses polinizadores cruciais e assegurar a saúde dos ecossistemas.

Uma das consequências e preocupações prementes relacionadas ao declínio das abelhas é o uso abusivo e a aplicação inadequada de pesticidas, apontados como uma das causas desse fenômeno (Porrini et al. 2003; Mullin et al. 2010). Esses produtos químicos podem estar associados ao enfraquecimento das abelhas, tornando-as suscetíveis às doenças, podendo comprometer seu desenvolvimento e habilidades de aprendizado (Blacquiere et al. 2012). O manejo responsável e sustentável dos pesticidas torna-se essencial para mitigar esses impactos negativos.

A abelha melífera *A. mellifera* tem sido amplamente empregada em diversos países como um indicador primário na avaliação de riscos de pesticidas, sendo extrapolados os dados dessas análises para outras espécies de abelhas, incluindo as nativas (Cham et al. 2017). Contudo, a equivalência na suscetibilidade entre abelhas melíferas e sem ferrão diante dos efeitos e avaliações de risco de pesticidas permanece incerta (IPBES 2016; Cham et al. 2018). Os efeitos dos pesticidas em *A. mellifera* e abelhas sem ferrão podem variar de acordo com a sensibilidade da espécie, o tamanho da abelha, estágio de vida (imaturo ou adulto), atividade de nidificação e o tipo comportamental de forrageio (Arena and Sgolastra 2014; Uhl et al. 2016;

Cham et al. 2018). Essa complexidade sublinha a necessidade de uma abordagem mais específica e cuidadosa na avaliação de riscos, visando a preservação da diversidade desses polinizadores vitais. Ao contrário das abelhas *A. mellifera*, as abelhas sem ferrão podem entrar em contato direto com resíduos de pesticidas no solo, pois muitas delas constroem seus ninhos no subsolo ou utilizam lama para a construção. Além disso, o pólen contaminado com resíduos de pesticidas que é oferecido às larvas durante seu desenvolvimento representa uma das vias principais de exposição (Arena, 2014).

As abelhas podem ser expostas a ambientes contaminados tanto em áreas tratadas (dentro do campo de controle de pragas) quanto em áreas não tratadas (fora do campo). Na exposição em áreas tratadas, durante o forrageio, as abelhas têm contato direto com nuvens de pulverização (exposição tópica) ou com a superfície pulverizada, incluindo resíduos nas folhas. Além disso, a exposição fora dessas áreas de tratamento pode ocorrer quando partículas de poeira, resultantes da pulverização, contêm resíduos que entram em contato direto com as abelhas durante o forrageio. Essa exposição também pode ocorrer de forma indireta por meio de inseticidas sistêmicos, que, ao serem absorvidos pelos tecidos vegetais, contaminam o pólen e o néctar (Lima e Rocha, 2012; Cham et al. 2020).

A toxicidade, segundo Cham et al. (2020), refere-se à capacidade de um composto ou produto em acarretar danos adversos em um indivíduo específico. A toxicidade pode ser estipulada realizando ensaios toxicológicos com indivíduos de interesse com objetivo de obter parâmetros de toxicidade. Pode ser analisada a mortalidade, resultado este gerado em concentrações letais  $CL_{50}$  ou dose letal  $DL_{50}$ , sendo, respectivamente, a concentração ou dose estimada correspondente a morte do 50% dos indivíduos testados nos ensaios (Cham et al. 2020). Além de causar efeitos tóxicos imediatos que podem levar à morte das abelhas, os inseticidas podem induzir mudanças no comportamento. Essas alterações, com o tempo, podem resultar em danos significativos para a sobrevivência e funcionamento da colônia (efeito subletal) (Lima et al. 2012).

O teste de toxicidade aguda oral e por contato é realizado com abelhas adultas da espécie *A. mellifera*. Essa espécie é reconhecida internacionalmente pelas instituições regulamentares e pela legislação tanto nos Estados Unidos quanto na Europa. No processo de teste, os pesticidas podem ser avaliados usando ingredientes ativos ou produtos formulados. A exposição das abelhas-operárias ocorre por meio de uma série de doses da substância em estudo, as quais são dissolvidas em um solvente adequado para as diferentes vias de exposição, conforme definido pelas diretrizes da OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) de 1998.

Nos últimos dez anos, pesquisas toxicológicas em abelhas sem ferrão têm contribuído com informações consideráveis sobre os efeitos letais e subletais de agroquímicos quando as abelhas adultas são expostas por via oral e contato (IPBES 2016; Botina et al. 2020; Bernardes et al. 2022). No entanto, apesar do grande número de espécies de abelhas sem ferrão que ocorrem no Brasil, ainda é baixo o número de estudos toxicológicos com pesticidas em diferentes espécies de abelhas sem ferrão (Lima et al. 2012; Bernardes et al. 2022). O inseticida Dimetoato é amplamente utilizado como padrão de referência em estudos toxicológicos com abelhas (OCDE, 1998) e estudos revelaram sua toxicidade em diferentes espécies de abelhas, incluindo *A. mellifera* (Gough et al. 1994; Uhl et al. 2016; Tadei et al. 2023). No entanto, ainda faltam dados toxicológicos em espécies de abelhas sem ferrão. Diante desse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos letais do inseticida organofosforado Dimetoato através da exposição aguda oral e por contato em três espécies de abelhas sem ferrão (*Cephalotrigona capitata*, *Tetragonisca angustula* e *Trigona spinipes*), observando a taxa de sobrevivência.



**Figura 1** - *Trigona spinipes*, *Cephalotrigona capitata*, *Tetragonisca angustula*

**Fonte:** alvarosilvajr – 2023, aranda87 – 2023, Richard Araya - 2021 respectivamente

## **2.OBJETIVOS**

Avaliar os efeitos letais na sobrevivência de abelhas sem ferrão através da exposição aguda oral e por contato ao inseticida dimetoato.

### **2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Estimar as curvas de sobrevivência no intervalo de 96h para exposição oral e por contato ao inseticida dimetoato;
- Determinar as doses do inseticida dimetoato para estimar a dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) para exposição oral e por contato ao inseticida dimetoato.

### **3.HIPÓTESE**

H0: A exposição oral e por contato ao inseticida dimetoato não afetam a sobrevivência das abelhas sem ferrão.

Ha: A exposição oral e por contato ao inseticida dimetoato afetam a sobrevivência das abelhas sem ferrão.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Abelhas

A realização dos ensaios de toxicidade foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO, ID 85749). Para os ensaios foram utilizadas três espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini): *Cephalotrigona capitata*, *Tetragonisca angustula*, e *Trigona spinipes*, coletadas na Universidade Federal de Viçosa (UFV) em três locais diferentes (Tabela 1). A espécie de *C. capitata* foi coletada no Apiário Central da UFV e dentro da universidade (UFV) próximo ao restaurante universitário I em um tronco de árvore onde o ninho foi construído naturalmente pela espécie. A espécie de *T. angustula* foi coletada no Apiário Central da UFV. Já a espécie de *T. spinipes* foram coletadas em um Meliponário particular a 10 km da UFV.

Abelhas forrageiras de três colônias da espécie *T. angustula* foram coletadas com o auxílio de um saco plástico colocado por cima da caixa racional até a abertura/entrada do ninho, no qual as abelhas subiram. Isto porque as abelhas não saíram pela entrada da caixa. Para a espécie de *T. spinipes*, as abelhas foram coletadas na entrada do ninho utilizando Erlenmeyer (500 mL). Já para coletar a *C. capitata* foram utilizados potes de plástico e com ajuda de umas pinças cada abelha foi coletada diretamente do ninho. Para que não houvesse diferença amostral para esta espécie, uma coleta maior de abelhas nos ninhos foi feita, assegurando que o tamanho amostral fosse o mesmo das espécies com três colônias. Para identificar as espécies foi observado o aspecto dos ninhos, destacando a entrada, como também as características morfológicas das abelhas operárias (Menezes et al. 2023). Após alguns minutos que foram coletadas as abelhas dos ninhos, 20 abelhas foram selecionadas aleatoriamente de acordo com o número de colônias, sendo que a *C. capitata* foi usada 20 abelhas de uma única colônia, já que as abelhas coletadas em ambiente natural foram limitadas devido a dificuldade de coletar a espécie. Já para as espécies de *T. angustula* e *T. spinipes* 20 abelhas provenientes das 3 colônias foram coletadas. As 20 abelhas de cada espécie foram pesadas para estipular a média do peso corporal (Tabela 1) com a utilização de uma balança de precisão (AG 200, Gehaka, São Paulo, Brasil).

Após a coleta, as abelhas foram levadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da UFV e colocadas em Incubadoras de Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O) com temperatura controlada, e em total escuridão. Para cada espécie, a temperatura foi ajustada seguindo a condições naturais encontradas na literatura (Tabela 1). As abelhas da mesma colônia e espécie, foram anestesiadas com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e divididas em potes plásticos preparados, antecipadamente, segundo a metodologia de Botina et al. (2020). Os potes plásticos utilizados eram de 500 mL para abelhas com peso corporal > que 70 mg ou 250 mL

para aquelas com peso corporal < de 70 mg. Cada espécie de abelha foi exposta a diluições progressivas do inseticida, sendo as doses determinadas através de bioensaios de mortalidade. Cada tratamento consistiu em três replicatas, sendo cada uma composta por 10 abelhas provenientes de colônias diferentes ou de uma única colônia.

Para promover o consumo do alimento contaminado, as abelhas foram submetidas a uma hora de jejum, conforme descrito por Botina et al. (2020). Um orifício de aproximadamente 13 mm de diâmetro foi feito na lateral inferior do recipiente plástico, onde um tubo de 2 µL (alimentador) perfurado foi inserido, contendo o alimento contaminado fornecido às abelhas durante o experimento. Na parte inferior externa do pote plástico foi pregado, com fita adesiva, um encaixe de madeira abaixo do furo do alimentador, para que o alimentador ficasse em um ângulo diagonal e, assim, o alimento sempre ia estar em contato com a abertura por onde podia ser consumido pelas abelhas. Na tampa dos potes plásticos foram feitos pequenos furos usando um soldador, para permitir a entrada de O<sub>2</sub>.

**Tabela 1.** Características gerais das espécies de abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula*, *Cephalotrigona capitata* e *Trigona spinipes*, pontos de coleta, número de ninhos, e quantidade aplicada na exposição por contato de Dimetoato.

Espécie	Local de coleta	Temperatura de exposição (°C)	Peso corporal médio (mg)	Origem dos ninhos	Número de ninhos	Quantidade aplicada na exposição por contato (µL)
<i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille, 1811)	Apiário Central da UFV, Viçosa, MG, 20°45'31.0"S 42°52'05.6"W	25°C	3.14	Caixa racional	3	-----
<i>Cephalotrigona capitata</i> (Smith, 1854)	Apiário Central da UFV, Viçosa, MG, 20°45'31.0"S 42°52'05.6"W	28°C	38.72	Caixa racional e ambiente natural	2	1
<i>Trigona spinipes</i> (Fabricius, 1793)	Meliponário particular no município de Coimbra, MG, 20°48'58,5"S 42°49'53,9"W	28°C	21.1	Caixa racional	3	1

#### 4.2 Bioensaios de Toxicidade

Para o bioensaio de toxicidade foi usado uma formulação comercial de dimetoato, (Dimexion<sup>®</sup>, concentrado emulsionável, composto de dimetoato: 400 g/L; cicloexanona: 308 g/L; xileno: 290 g/L; outros: 83 g/L; FMC Química do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), seguindo as orientações da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998a,1998b) e as diferentes doses (Tabela 2 e 3) foram preparadas. A diluição do inseticida

foi preparada em uma solução de sacarose 50% p/p (Êxodo Científica – Sumaré, São Paulo, Brasil) para cada tratamento. Uma solução de sacarose sem inseticida foi utilizada para avaliar a morte natural ou controle. A taxa de sobrevivência foi avaliada a cada 24h, até completar 96h. As abelhas foram consideradas mortas quando se encontravam completamente imóveis.

O procedimento experimental envolve a preparação de soluções de dimetoato em diversas concentrações para avaliação dos efeitos em abelhas. Segundo a OECD (1998) a quantidade de dieta dosada por abelha é de 20 uL, a partir desse dado foi estipulado a quantidade de ingrediente ativo de dimetoato que seria utilizado para fazer a concentração de 100%. Inicialmente, a dose de referência foi estabelecida com base na LD50 – 24h, situada na faixa de 0,10 a 0,35 µg de ingrediente ativo por abelha *A. melífera*. Para a solução de 100%, 3,75 mg de dimetoato foram pesados e misturados com solução de sacarose 50% p/v, totalizando um volume final de 100 mL (onde  $0.30 \mu\text{g a.i. dimetoato /abelha} \div 20 \mu\text{L/abelha} = 0.015 \mu\text{g a.i./}\mu\text{L} = 0.015 \text{ mg a.i./mL} * 100 \text{ mL} \div 0.40 = 3.75 \text{ mg}$ ). Onde foi pesado 3.75 mg do produto formulado (dimetoato) e completado com solução sacarose 50% p/p para se obter um volume final de 100 mL. Para as demais concentrações foram usadas as concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,3% e 3,1%, as quais seguiram o fator de diluição de 2. Além disso, a preparação das anteriores concentrações foram a partir da solução de 100% (Tabela 2), estimadas usando a seguinte fórmula:

$$C1.V1=C2.V2$$

Onde C1 é a concentração inicial (%), V1 o volume inicial (mL), C2 a concentração final (%) e V2 o volume final (mL).

**Tabela 2** - Concentrações diluídas de dimetoato para exposição oral das espécies *Cephalotrigona capitata* (Smith, 1854) e *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811).

Exposição Oral - Formulação comercial de dimetoato (400 g/L) - 40%		
Concentração (%)	Diluições (mL)	Solução Total
100	3,75 ul de dimetoato em 100 mL sacarose	100 mL
50	5ml da (solução de 100%) + 5 mL de sacarose	10 mL
25	2,5 mL da (solução de 100%) + 7,5 mL de sacarose	10 mL
12,50	2,5 mL da (solução de 50%) + 7,5 mL de sacarose	10 mL
6,30	2,52 mL da (solução de 25%) + 7,48 mL de sacarose	10 mL
3,10	2,48 mL da (solução de 12,5%) + 7,52 mL de sacarose	10 mL

Na aplicação por contato, conforme o protocolo da OECD (1998), a quantidade de Dimetoato foi determinada com base no peso de cada abelha. Para abelhas com peso superior a 40 mg, foi

estabelecido o volume de 2 µl da solução contendo a substância em estudo, a ser aplicado na face dorsal do tórax de cada abelha. No caso de abelhas com peso entre 9 e 40 mg, a aplicação consiste em 1 µl, enquanto para aquelas com peso inferior a 9 mg, recomenda-se a aplicação de 0,5 µl no tórax de cada abelha.

O composto tóxico padrão incluído na série de testes, por meio da exposição por contato, foi o Dimetoato, para o qual a LD50 em exposição oral por 24 horas situou-se na faixa de 0,10 a 0,30 µg de ingrediente ativo por abelha *A. mellifera*. Para a preparação da solução estoque, utilizou-se uma concentração de 15 mg a.i./mL da concentração estoque primária. Esse valor foi então multiplicado pelo volume total de 10 mL e, em seguida, dividido por 40%, correspondente à proporção de dimetoato na formulação utilizada. As diluições foram preparadas com concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,3% e 3,1%, as quais foram derivadas da solução estoque. (Tabela 3). Onde C1 é a concentração inicial (%), V1 o volume inicial (mL), C2 a concentração final (%) e V2 o volume final (mL), mediante a seguinte fórmula:

$$C1.V1=C2.V2$$

**Tabela 3** - Concentrações diluídas de dimetoato para exposição por contato das espécies *Cephalotrigona capitata* (Smith, 1854) e *Trigona spinipes* (Fabricius, 1793).

Exposição por Contato - Formulação comercial de dimetoato (400 g/L) - 40%		
Concentração (%)	Diluições (mL)	Solução Total
Solução estoque	37,5 ul de dimetoato em 10 mL água	10 mL
100	1 ml da (solução estoque) + 9 mL de acetona	10 mL
50	5 mL da (solução de 100%) + 5 mL de acetona	10 mL
25	5 mL da (solução de 50%) + 5 mL de acetona	10 mL
12,50	5 mL da (solução de 25%) + 5 mL de acetona	10 mL
6,30	5 mL da (solução de 12,5%) + 5 mL de acetona	10 mL
3,10	5 mL da (solução de 6,30 %) + 5 mL de acetona	10 mL

#### 4.2.1. Exposição oral

Pré-testes a partir da dose máxima da DL50 do dimetoato para *A. mellifera* foram feitos para selecionar cinco doses, compreendendo um intervalo de 1 a 100% de mortalidade, e assim, estimar a DL50 para cada espécie utilizada. A DL50 de referência usada para o dimetoato foi na faixa de 0,10 – 0,35 µg de componente ativo (i.a.) por forrageira *A. mellifera*, seguindo o protocolo da OECD (1998a).

Depois de completar 1h de jejum, os alimentadores com as diferentes diluições (Tabela 2) foram fornecidos para as abelhas por um período de 6h, já para o grupo controle foi fornecido

somente solução de sacarose durante todo o ensaio. Para determinar o consumo de alimento antes e após a exposição, o alimentador foi pesado tanto para o grupo de controle quanto para o grupo alimentado com inseticida. Depois de completar o período de 6h, o alimentador foi pesado e substituído por um alimentador contendo apenas solução de sacarose, sem qualquer restrição até o final do experimento. Os valores de DL50 da exposição oral foram obtidos a partir da quantidade de consumo médio do inseticida por abelha tanto da *C. capitata* e *T. angustula*.

#### **4.2.2. Exposição por contato**

Similar à exposição oral, usou-se como referência a DL50 do dimetoato, a qual se encontra na faixa de 0,10 – 0,30 µg de componente ativo (i.a.) por forrageira *A. mellifera*, seguindo o protocolo da OECD (1998b). Uma solução estoque foi preparada contendo 15mL de água destilada e 37,5 µl de ingrediente ativo (i.a) de dimetoato. A partir dessa solução estoque foram preparadas cinco soluções (Tabela 3), as quais foram completadas com acetona até atingir o volume final de 10 mL de solução. As concentrações foram usadas para obter a mortalidade de 1 a 100% dos indivíduos para estimar a DL50 de cada espécie. De acordo com a OECD (1998b), a acetona não é considerada uma substância tóxica para as abelhas. Utilizando uma micropipeta de 5 µL, a solução de inseticida foi aplicada sobre a parte dorsal do tórax das abelhas. A *C. capitata* e *T. spinipes* por apresentarem peso corporal maior que 9 mg recebeu 1 µL da solução (Tabela 1). O grupo de controle recebeu apenas a acetona. No alimentador para o experimento de contato foi adicionado apenas solução de sacarose em uma proporção de 1:1. A sobrevivência das abelhas foi monitorada ao longo de 96h.

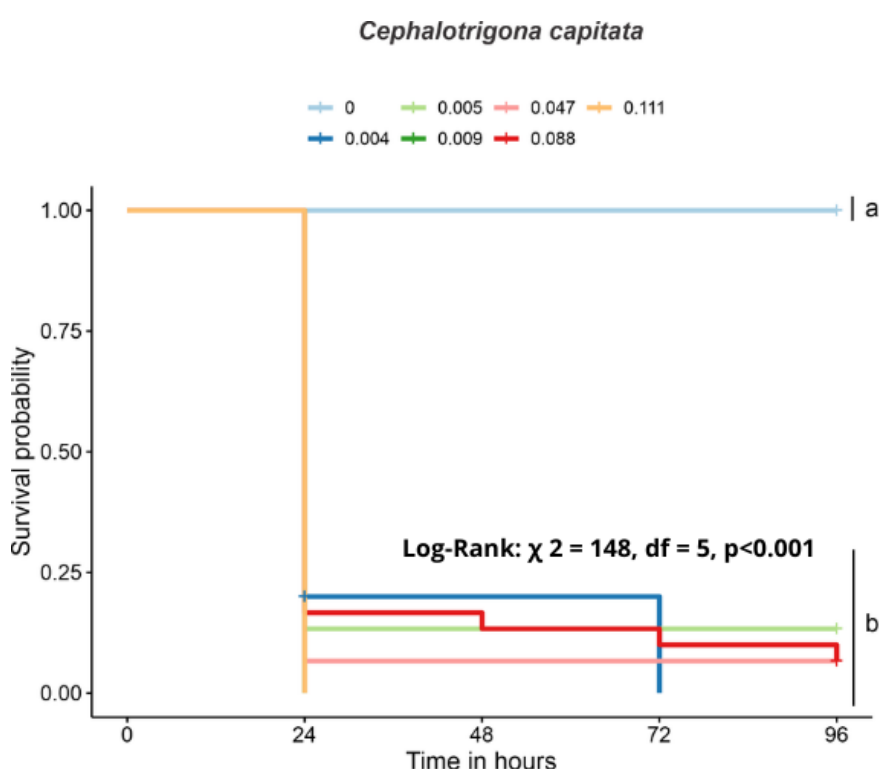
#### **4.3. Análise Estatística**

As análises foram feitas usando o software R (R Core Team, 2023). Os dados de sobrevivência foram submetidos a uma análise de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas geradas foi testada pelo teste de log-rank. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$  (R Core Team, 2023). Para estimar as DL50 e os intervalos de confiança 95% (IC-95%) foi utilizado análise de probit (PROC PROBIT; SAS Institute, 2008).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Curvas de sobrevivência da exposição oral

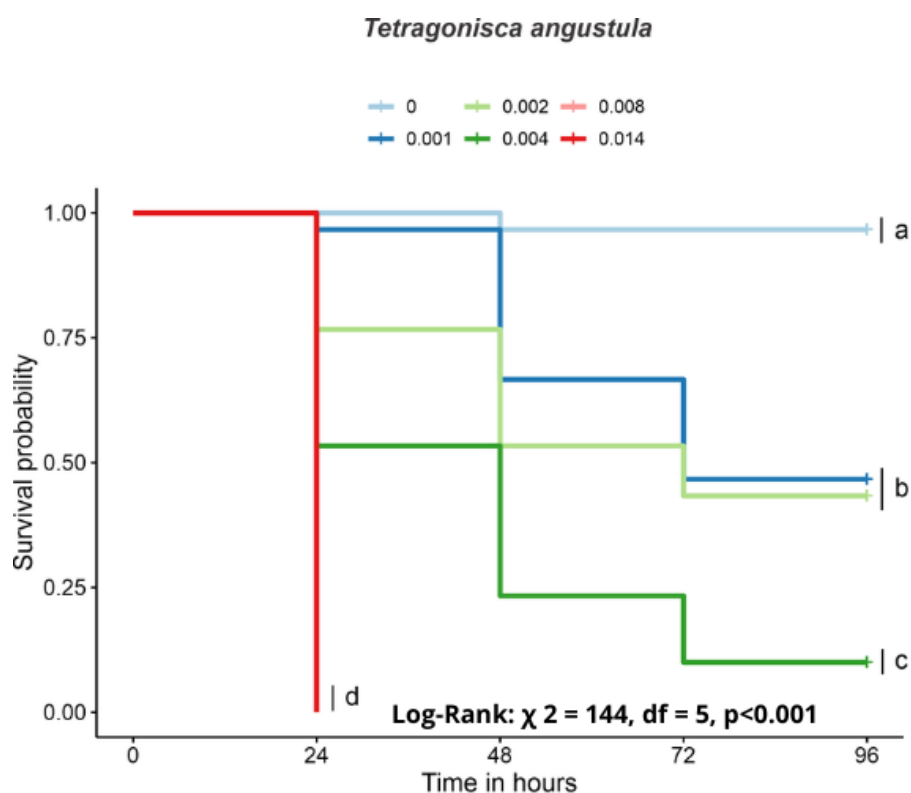
As duas espécies de abelhas, *C. capitata* e *T. angustula*, expostas ao inseticida dimetoato por meio de exposição oral tiveram impacto negativo em sua sobrevivência ( $\chi^2=148$ , 5df,  $p<0,001$ ) e ( $\chi^2=144$ , 5df,  $p<0,001$ ), respectivamente. Comparando a dose mais alta utilizada para a espécie de *C. capitata* de 0,111  $\mu\text{g ia/abelha}$  e 0,014  $\mu\text{g ia/abelha}$  para a *Tetragonisca angustula* em relação a taxa de sobrevivência na exposição oral, fica evidente uma relação inversamente proporcional, onde doses mais elevadas do composto resultaram em taxas de sobrevivência mais baixas apresentando uma diferença nos tratamentos de sobrevivência (Figura 1 e 2).



**Figura 2** - Curvas de sobrevivência de abelhas forrageiras *Cephalotrigona capitata* expostas por via oral a diferentes doses do inseticida dimetoato ( $\mu\text{g ia/abelha}$ ). A figura mostra a probabilidade de sobrevivência da espécie expostas ao dimetoato em função do tempo. As abelhas foram expostas (alimentadas) por um período de 6h ao dimetoato, e a sobrevivência foi observada a cada 24h, num intervalo total de 96h. As diferentes cores representam cada dose do inseticida. Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística entre as curvas ( $p < 0,05$  – Log-Rank).

Forrageiras de *C. capitata* expostas ao dimetoato tiveram redução drástica na probabilidade de sobrevivência para todas as doses testadas em comparação ao controle. Na Figura 1, nota-se que esta espécie apresentou alta toxicidade para todas as doses após 24h, com uma probabilidade de sobrevivência abaixo de 25% em comparação com o controle, que

registrou 0% de mortes. Por não conseguirmos doses que cubram a faixa entre 0% e 100% de sobrevivência, não foi possível estimar as  $DL_{50}$  para esta espécie. As doses testadas, de 0,111  $\mu\text{g}$  ia/abelha e 0,009  $\mu\text{g}$  ia/abelha (sendo que na figura 3 a curva verde escuro está representada juntamente com a curva vermelha, já que ambas têm a mesma taxa de sobrevivência), apresentaram a mesma resposta toxicológica, resultando em 0% de sobrevivência nas primeiras 24h.



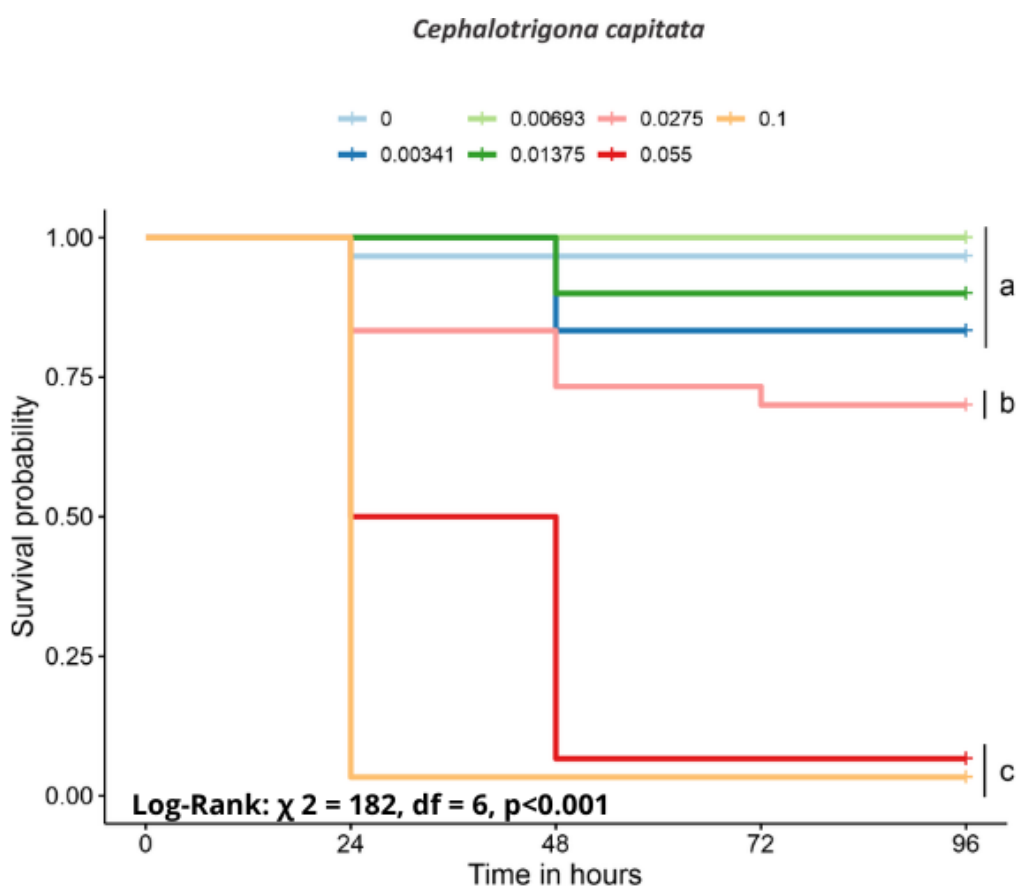
**Figura 3** - Curvas de sobrevivência de abelhas forrageiras *Tetragonisca angustula* expostas por via oral a diferentes doses do inseticida dimetoato ( $\mu\text{g}$  ia/abelha). A figura mostra a probabilidade de sobrevivência da espécie expostas ao dimetoato em função do tempo. As abelhas foram expostas (alimentadas) por um período de 6h com agrotóxico, e a sobrevivência foi observada a cada 24h, num intervalo total de 96h. As diferentes cores representam cada dose do inseticida. Letras minúsculas diferentes significa diferença estatística entre as curvas ( $p < 0,05$  – Log-Rank).

Forrageiras de *T. angustula* tiveram redução na sobrevivência em comparação ao controle (Figura 2). Na análise de sobrevivência na exposição oral, observou-se uma diferença entre os tratamentos após 24h de exposição. As duas doses mais elevadas testadas, de 0,0014  $\mu\text{g}$  ia/abelha e 0,008  $\mu\text{g}$  ia/abelha (sendo que na figura 2 a curva rosa está representada juntamente com a curva vermelha, já que ambas têm a mesma taxa de sobrevivência), apresentaram a mesma resposta toxicológica, resultando em 0% de sobrevivência nas primeiras 24h. Em seguida, a dose de 0,004  $\mu\text{g}$  ia/abelha mostrou uma taxa de sobrevivência de 50%, enquanto a de 0,002  $\mu\text{g}$  ia/abelha registrou uma redução de 25% na taxa de sobrevivência. A

DL<sub>50</sub> do dimetoato para *T. angustula* foi de 0.00356 µg ia/abelha [(0.00287 - 0.00460); inclinação = 3.1 ± 0.5; = 2.5754; df 2; P = 0.2759].

## 5.2. Curvas de sobrevivência exposição por contato

Nas figuras 3 e 4, as abelhas forrageiras das duas espécies, *C. capitata* e *T. spinipes*, expostas ao inseticida dimetoato por contato demonstraram impacto na taxa de sobrevivência (y=182, 6df, p<0,001) e (y=135, 5df, p<0,001), respectivamente, apresentando uma diferença nos tratamentos, as maiores doses do inseticida diminuíram a taxa de sobrevivência das tratadas.

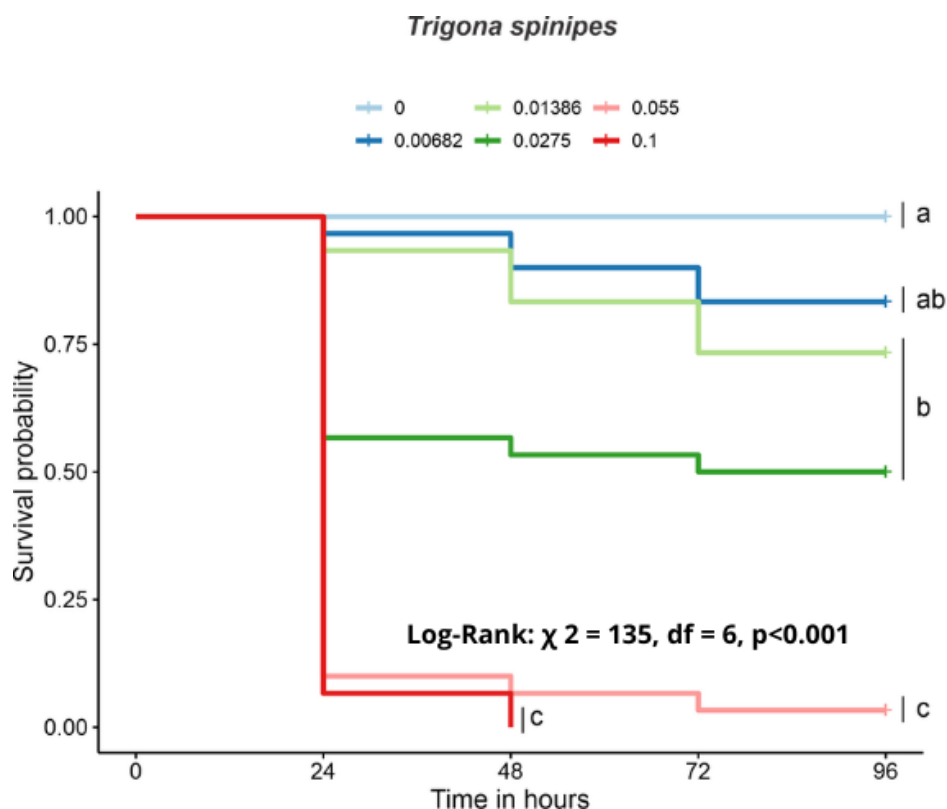


**Figura 4** - Curvas de sobrevivência de abelhas forrageiras *Cephalotrigona capitata* expostas por contato a diferentes doses do inseticida dimetoato (µg ia/abelha). A figura mostra a probabilidade de sobrevivência da espécie exposta por contato em função do tempo. As abelhas receberam na parte dorsal do tórax diferentes concentrações e alimentadas com solução de sacarose no intervalo das 96h em que a sobrevivência foi analisada. As diferentes cores representam cada dose do inseticida. Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística (p < 0,05 – Log-Rank).

Na figura 3 a espécie de *C. capitata*, mostrou baixa toxicidade para as três diferentes doses de 0,00341 µg ia/abelha, 0,01375 µg ia/abelha e 0,00693 µg ia/abelha estabelecendo uma relação de sobrevivência próxima ao controle. A probabilidade de sobrevivência foi maior não

havendo diferença entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), com uma taxa de mortalidade inferior a 50% em 96h para todas as três doses (figura 3).

A  $DL_{50}$  de *C. capitata* foi de  $0.05058 \mu\text{g ia/abelha}$  [(0.04257 - 0.05941); inclinação =  $5 \pm 0.9$ ;  $\chi^2 = 4.9334$ ;  $df = 4$ ;  $P = 0.2942$ ]



**Figura 5** - Curvas de sobrevivência de abelhas forrageiras *Trigona spinipes* expostas por contato a diferentes doses do inseticida dimetoato ( $\mu\text{g ia/abelha}$ ). A figura mostra a probabilidade de sobrevivência da espécie exposta por contato em função do tempo. As abelhas receberam na parte dorsal do tórax diferentes concentrações e alimentadas com solução de sacarose no intervalo das 96h em que a sobrevivência foi analisada. As diferentes cores representam cada dose do inseticida. Letras minúsculas diferentes significam diferença estatística ( $p < 0,05$  – Log-Rank).

A probabilidade de sobrevivência diminuiu significativamente comparado ao controle no tratamento de  $0,055 \mu\text{g ia/abelha}$  e  $0,01386 \mu\text{g ia/abelha}$  (Figura 4). A taxa de mortalidade foi inferior a 50% nas concentrações de  $0,00682 \mu\text{g ia/abelha}$ ,  $0,01386 \mu\text{g ia/abelha}$  e  $0,0275 \mu\text{g ia/abelha}$ , exceto para a de  $0,055 \mu\text{g ia/abelha}$  que apresentou uma taxa de sobrevivência inferior 25% em relação ao controle com 0% de mortes.

A  $DL_{50}$  de *T. spinipes* foi de  $0.02936 \mu\text{g ia/abelha}$  [(0.02441 - 0.03526); inclinação =  $3.6 \pm 0.5$ ;  $\chi^2 = 5.6188$ ;  $df = 3$ ;  $P = 0.1317$ ].

## 6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o declínio de abelhas tem chamado a atenção e uma das possíveis causas é a contaminação por pesticidas IPBES (2016). Apesar da maior diversidade de espécies de abelhas sem ferrão se encontrarem no Brasil, as regulamentações brasileiras são baseadas em protocolos padronizados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) utilizando a *Apis mellifera* como referência de estudo. Isto, evidencia um problema que tem preocupado a academia e órgãos governamentais que realizam pesquisas nas regiões neotropicais, onde há presença de abelhas sem ferrão (Dorigo et al. 2019).

O dimetoato é um organofosforado que inibe a enzima acetilcolinesterase em abelhas, causando um acúmulo de acetilcolina no sistema nervoso, levando a contrações musculares constantes e, até, podendo levar à morte do indivíduo (Christen et al. 2019). Esse inseticida é amplamente avaliado em *A. mellifera*, mas não em espécies de abelhas sem ferrão (Gough et al. 1994; Uhl et al. 2016; Tadei et al. 2023). Nossos resultados corroboram a alta toxicidade do dimetoato para as espécies estudadas no presente trabalho, mostrando uma relação de dose – resposta, ou seja, quanto maior a quantidade do dimetoato, menor a taxa de sobrevivência das abelhas. Onde, a dose mais alta utilizada no estudo se encontra na faixa da DL<sub>50</sub> para *A. melífera*, levou a mortalidade de mais de 80% dos indivíduos tratados tanto via exposição oral quanto por contato, nas três espécies de abelhas sem ferrão testadas, mostrando uma maior sensibilidade das espécies expostas se comparada a *Apis melífera*. Com o estudo fica evidente que o potencial tóxico de pesticidas para *Apis melífera* não deve ser extrapolado para outras espécies de abelhas.

Por não conseguirmos doses que cubram a faixa entre 0% e 100% de sobrevivência, não foi possível estimar as DL<sub>50</sub> para a espécie *Cephalotrigona capitata* expostas por via oral. Para que seja possível estimar uma DL<sub>50</sub> é necessário novos testes de toxicidade usando a mesma espécie. A dose mais alta de Dimetoato utilizada em um novo teste para estimar a DL<sub>50</sub> seria a menor dose utilizada no presente estudo de 0,004 µg ia/abelha partindo desta dosagem outras seriam estipuladas para tentar estimar a DL<sub>50</sub> para a espécie *C. capitata*.

O inseticida organofosforado para a espécie de *C. capitata* apresentou alta mortalidade nas primeiras 24h, via exposição oral. Assim como nas espécies de *Scaptotrigona postica* que em 24h de exposição tópica ao dimetoato, em diferentes doses, foi considerado altamente tóxico para as abelhas (Macedo, 2016). Assim, foram observados efeitos semelhantes do inseticida para diferentes vias de contaminação e espécies tratadas. Nenhum trabalho foi encontrado relacionado a toxicidade aguda de *C. capitata*. Portanto, o presente estudo representa o primeiro relato de uma avaliação toxicológica com esta espécie. Onde cerca de 65,9% dos estudos que

tratam sobre os efeitos dos pesticidas é voltado para *A. mellífera*, e apenas 2,3% em abelhas sem ferrão (Bernardes et al, 2022). Ressaltando a importância da inclusão de espécies de abelhas sem ferrão em testes de toxicidade, já que a exposição aos pesticidas para a maior parte das espécies de abelhas sem ferrão é desconhecida, sendo esta informação importante para contribuir com práticas agrícolas menos prejudiciais as diversas espécies e auxiliando na regulamentação de pesticidas destinados a preservar a diversidade de abelhas.

Em um estudo utilizando espécies de abelhas sem ferrão, foram observados efeitos subletais associados a locomoção da espécie de *Megachile rotundata*, onde ela apresentava espasmos abdominais, locomoção descoordenada e dificuldade de endireitamento, causado pela exposição por contato ao dimetoato (Ansell et al. 2021). Estimar a DL50 para diferentes espécies como realizado nesse trabalho, corrobora com dados importantes para novos estudos acerca dos efeitos subletais tanto para as espécies trabalhadas, quanto para outras.

Nota-se uma sensibilidade elevada às diferentes doses de dimetoato na exposição oral da espécie *T. angustula*. A mesma tendência na sensibilidade foi observada para a mesma espécie de abelhas sem ferrão na exposição via oral ao dimetoato em um estudo realizado por Jacob et al. (2019), onde segundo ele o dimetoato pode afetar negativamente a atividade de polinização das abelhas. As altas concentrações de agrotóxicos levam a morte de abelhas, enquanto baixas concentrações podem influenciar no comportamento, afetando a manutenção da colmeia, atividade ecossistêmica e visitação às culturas (Nocelli et al. 2012).

Cabe ressaltar que o efeito dos pesticidas em abelhas selvagens está ligado à sensibilidade de cada espécie independentemente, tendo que levar em consideração seu estágio de desenvolvimento, o tipo de nidificação e o forrageio (Arena e Sgolastra, 2014). Em um estudo usando abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona postica* e o inseticida dimetoato foi constatado que, após a exposição aguda oral e crônica, as concentrações de dimetoato causaram alterações morfológicas no intestino e nos túbulos de Malpighi, com perda de material citoplasmático nas abelhas tratadas (Leticia Orsi, 2020). Logo, um estudo do impacto dos efeitos subletais na fisiologia e no comportamento devem ser levados em consideração (Desneux et al. 2007). Uma característica que pode determinar a sensibilidade em abelhas é o peso corporal, que tem sido apontado como um fator, onde as abelhas com tamanho menores são mais sensíveis em relação as abelhas com peso corporal maior (Tai et al. 2022). Porém, no presente estudo, o peso não foi um fator influenciável da sensibilidade entre as espécies expostas ao dimetoato. *Cephalotrigona capitata* (peso corporal = 38,72 mg) possui mais sensibilidade ao dimetoato que a *Tetragonisca angustula* (peso corporal = 3,14 mg) na exposição oral. Por outro lado, *Trigona spinipes* (peso corporal = 21,14 mg) com peso corporal

menor que da *Cephalotrigona capitata* (peso corporal = 38,72 mg) mostrou ser mais sensível na exposição por contato. Havendo uma relação inversa entre o tamanho do corpo e a área de superfície, abelhas menores podem ser expostas por contato por unidade de massa corporal do que as abelhas maiores (Ward et al., 2022).

A resposta aos efeitos letais do dimetoato em abelhas sem ferrão pode variar tanto de uma espécie para outra, como também de acordo com a via de exposição ao inseticida o que fica evidente ao observarmos uma diferença na taxa de sobrevivência entre a exposição oral de *C. capitata* e *T. angustula*, uma vez que a primeira espécie mostrou uma resposta mais letal ao ser exposta. A espécie *C. capitata* mostrou ser mais sensível ao dimetoato quando exposta via oral do que por contato. Logo, as diferentes vias de exposição nos testes toxicológicos com abelhas sem ferrão devem ser consideradas (Cham et al. 2019).

Em um estudo analisando os efeitos do dimetoato em pupas e larvas de *A. mellifera* criadas em condições laboratórias, pode ser observado que o desenvolvimento na fase larval não apresentou em pré-pupa o desenvolvimento de discos imaginais (células indiferenciadas), que vão originar as pernas, antenas e outros apêndices (Silva, 2014). A identificação de DL50 pode auxiliar em outros estudos, como o citado acima, uma vez que, conhecendo a DL50, pode-se ter uma referência da dose letal mediana que mata 50% dos indivíduos, e partindo dessa dose, estipular valores menores para outros tipos de testes de toxicidade, como o estudo acima, onde usou-se larvas de abelhas melífera, sendo que estas apresentam maior sensibilidade aos pesticidas quando ainda estão em desenvolvimento, fase larval.

O presente estudo apresenta dados relevantes sobre os efeitos tóxicos do dimetoato para em abelhas sem ferrão na faixa de 0,10 – 0,30 µg de componente ativo (i.a.) por forrageira *A. mellifera*, para a exposição por contato e na faixa de 0,10 – 0,35 µg de componente ativo (i.a.) por forrageira *A. mellifera*, seguindo o protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Sendo o primeiro estudo a obter dados a respeito do impacto de um inseticida na espécie *Cephalotrigona capitata*, e contribuindo com mais informações sobre os efeitos da exposição oral na espécie *Tetragonisca angustula*, e os efeitos letais na exposição por contato da *Trigona spinipes*.

Das 3 espécies de abelhas sem ferrão testadas, 2 estão inclusas na lista de abelhas nativas que devem ser avaliadas quanto ao risco de agroquímicos, de acordo com o IBAMA (Pires et al. 2018). Dentre essas espécies, *T. spinipes*, *T. angustula*, foram selecionadas como espécies prioritárias para análise de risco no Brasil. Vale destacar que *C. capitata* nos nossos estudos mostrou ser mais sensível ao dimetoato, principalmente na exposição oral, mas a espécie não tem sido considerada pelas autoridades brasileiras na seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de riscos a agroquímicos (Pires et al. 2018).

## 7. CONCLUSÃO

- O trabalho realizado foi conforme os protocolos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para exposição aguda oral e por contato. Fornecendo resultados que podem ser contextualizados internacionalmente e contribuindo para uma compreensão mais ampla dos riscos associados a esse inseticida específico.
- No presente estudo, ficou evidente que quanto maior a dose de dimetoato, menor a taxa de sobrevivência das abelhas tratadas. A exposição via aguda oral mostrou ser altamente tóxica para as diferentes doses usadas. As diferentes vias de contaminação geraram diferentes resultados, sendo necessário a aplicação dessas duas vias em caso de novos estudos.
- O estudo realizado fornece dados relevantes que podem contribuir para pesquisas futuras e mais aprofundadas tanto efeitos fisiológico, neurológicos, além dos efeitos letais e subletais abordados, podendo ajudar em práticas de conservação e melhores aplicações de substâncias nas atividades agrícolas sem maiores danos as abelhas nativas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- M., ... & Cione, A. P. (2018). Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco
- Abati, R. Sampaio, AR, Maciel, RMA, Colombo, FC, Libardoni, G. Battisti, L. ... & Potrich, M. (2021). Abelhas e agrotóxicos: O impacto da pesquisa e as relações cienciométricas. **Ciência Ambiental e Pesquisa em Poluição**, 28 (25), 32282-32298.
- Ansell GR, Frewin AJ, Gradish AE, Scott-Dupree CD. Toxicidade de contato de três inseticidas para uso em avaliações de risco de pesticidas de nível I com *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae) PeerJ 9: e10744, 2021
- Arena M, Sgolastra F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology** 23:324–334, 2014.
- Ascher JS, Pickering J Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera:Meliponini), 2014.
- Bernardes RC, Botina LL, Araújo R dos S. Artificial Intelligence-Aided Meta-Analysis of Toxicological Assessment of Agrochemicals in Bees. *Front Ecol Evol* 10:425, 2022.
- Blacquière, T. Smagghe, G. van Gestel, CAM.. Neonicotinóides em abelhas: uma revisão sobre concentrações, efeitos colaterais e avaliação de risco. **Ecotoxicologia** 21, 973–992 (2012).
- Botina LL, Bernardes RC, Barbosa WF. Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). *MethodsX* 7:100906, 2020.
- Breeze TD, Vaissière BE, Bommarco R, Petanidou T, Seraphides N, Kozák L, Scheper J, Biesmeijer JC, Kleijn D, Gyldenkerne S, Moretti M, Holzschuh A, Steffan-Dewenter I, Stout JC, Pärtel M, Zobel M, Potts SG. As políticas agrícolas exacerbam as incompatibilidades entre a oferta e a procura dos serviços de polinização das abelhas em toda a Europa. *PLoS Um* 9:e82996, 2014.
- Cham KDO, Rebelo RM, Oliveira RDP, et al (2017) Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília: Ibama/Diqua

- Cham KO, Nocelli RCF, Borges LO. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. *Environ Entomol* 48:36–48, 2018.
- Cham, K.O.; Rebelo, R.M.; Oliveira, R.P.; Ferro, A.A.; Silva, F.E.C.V.; Borges, L.O.; Saretto, C.O.S.D.; Tonelli, C.A.M.; Macedo, T.C. Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. Brasília, DF: IBAMA/DIQUA, 114p. (2020).
- Cham, Karina O. et al. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. *Environmental entomology*, v. 48, n. 1, p. 36-48, (2019).
- Cham, KO; Nocelli, RCF; Borges, LO; Viana-Silva, FEC; Tonelli, CAM; Malaspina, O.; Menezes, C.; Rosa-Fontana, AS; Blochtein, B.; Freitas, BM; Pires, CSS; Oliveira, FF; Contrera, FAL; Torezani, KRS; Ribeiro, MF; Siqueira, MAL; Rocha, MCLSA (2018). Paradigma de Avaliação da Exposição a Agrotóxicos para Abelhas Sem Ferrão. **Entomologia Ambiental**, XX(X): 1-13.
- Christen, Verena, Yvonne Joho, Maren Vogel e Karl Fent. "Efeitos transcricionais e fisiológicos do piretróide deltametrina e do dimetoato organofosforado no cérebro de abelhas melíferas (*Apis mellifera*)."  
*Poluição ambiental* 244 : 247-256, 2019.
- Cortopassi-Laurino, M. Imperatriz-Fonseca, VL, Roubik, DW, Dollin, A. Heard, T. Aguilar, I. ... & Nogueira-Neto, P. Meliponicultura global: desafios e oportunidades. *Apidologie* ,37 (2), 275-292. de agrotóxicos. Brasília: Ibama, 2006.
- De Oliveira Cruz, Darci; De Oliveira Campos, Antonio. Polinização por abelhas em cultivos protegidos. *Current Agricultural Science and Technology*, v. 15, n. 1-4, 2009. de Oliveira Jacob, Cynthia Renata, et al. "O impacto de quatro inseticidas neonicotinóides amplamente utilizados em *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae)."  
*Quimosfera* 224: 65-70, 2019.
- Desneux, Nicolas, Axel Decourtye e Jean-Marie Delpuech. "Os efeitos subletais dos pesticidas nos artrópodes benéficos." *Anu. Rev. Entomol.* 52: 81-106, 2007.
- Dorigo AS, Rosa-Fontana AdS, Soares-Lima HM, Galaschi-Teixeira JS, Nocelli RCF, et al. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PLOS ONE* 14(3): e0213109, 2019.

- Fletcher, M. A. R. K.; Barnett, Libby. Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. *Bulletin of insectology*, v. 56, n. 1, p. 141-145, 2003.
- Freitas, Breno Magalhães; Pinheiro, José Nunes. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. *Oecologia australis*, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010.
- Gough HJ, McIndoe EC, Lewis GB (1994) The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981–1992. *J Apic Res* 33:119–125.
- IPBES (2016). The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. S.G. Potts, V. L. Imperatriz-Fonseca, and H. T. Ngo (eds). Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services, Bonn, Germany. 552 pages. Jacob, C. R., Malaquias, J. B., Zanardi, O. Z., Silva, C. A., Jacob, J. F., & Yamamoto, P. T. (2019). Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). ***Ecotoxicology***, 28(7), 744-753, 2019.
- Kremen, Claire; Williams, Neal M.; THORP, Robbin W. Polinização de culturas por abelhas nativas em risco de intensificação agrícola. *Anais da Academia Nacional de Ciências*, v. 99, n. 26, pág. 16812-16816, (2002).
- Lima, M.C.; Rocha, S.A. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: Ibama, (2012).
- Lima, MAP, Martins, GF, Oliveira, EE *et al.* Estresse induzido por agroquímicos em abelhas sem ferrão: peculiaridades, fundamentos e desafios. *J Comp Physiol A* 202, 733–747 (2016).
- Macedo, Raquel Chaves. "Toxicidade do acetamiprido e dimetoato para abelha *Scaptotrigona postica* latreille, 1804." (2016).
- Mullin, Christopher A. Maryann Frazier, James L. Frazier, Sara Ashcraft, Roger Simonds, Dennis VanEngelsdorp e Jeffery S. Pettis. "Altos níveis de acaricidas e agroquímicos em apiários norte-americanos: implicações para a saúde das abelhas." *PLoS* um 5, não. 3 : e9754, 2023.

- Nocelli, R. C. Roat, T. C. Zacarin, E. C. S. & Malaspina, O. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. *Semana dos Polinizadores*, 3, 196-212, 2012.
- Nogueira-Neto, Paulo N 778v *Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão*. — São Paulo: Editora Nogueirapis, 445 p, 1997.
- OECD Guidelines for the testing of Chemicals, section 2: effects on biotic systems.
- OECD. (1998a). Test No. 213: honeybees, acute oral toxicity test. OECD Guidelines for the testing of Chemicals, section 2: effects on biotic systems.
- OECD. (1998b). Test No. 214: honeybees, acute contact toxicity test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- Oliveria, Favízia Freitas de, et al. "Guia ilustrado das abelhas" sem ferrão" das Reservas Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)." (2013).
- Pinheiro, M.; Caglianone, MC; Nunes, Cep; Sigrist, MR; Dos Santos, IA *Polinização por abelhas*. In: Rech, AR; Agostini, K.; Oliveira, PE; Machado, IC (Orgs.). *Biologia da polinização*. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, cap. 9, pág. 205-234, 2014.
- Pires, C. S. S., Torezani, K. D. S., Cham, K. O., Viana-Silva, F. E. C., Borges, L. O., Tonelli, C. Potts, SG; Biesmeijer, JC; Kremen, C.; Neumann, P.; Schweiger, O.; Kunin, Nós. Declínio global de polinizadores: tendências, impactos e motivadores. *Tendências em Ecologia e Evolução*, 25(6): 345-353, 2010.
- R Core Team, A. & R Core Team. *R: A language and environment for statistical*, 2023.
- Ramalho, Mauro. Abelhas sem ferrão e árvores floridas em massa na copa da Mata Atlântica: uma estreita relação. *Acta Botânica Brasileira*, v. 18, p. 37-47, 2004.
- Roubik DW. *Stingless Bee (Apidae: Apinae: Meliponini) Ecology* 2023.
- SAS Institute, 2008. SAS Institute. *SAS/STAT User's Guide*. SAS, Cary, NC, USA (2008).

- Scaffé, Rodolfo & Maia, Ulysses & Carvalho, Airton & Imperatriz-Fonseca, V.L. Diagnóstico da Meliponicultura no Brasil. *Mensagem Doce*. 120. 7-9, 2013.
- Slaa, Ester Judith et al. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, v. 37, n. 2, p. 293-315, 2006.
- Tomé, H. V. V. Barbosa, W. F. Martins, G. F. & Guedes, R. N. C. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere*, 124, 103-109, 2015.
- Vanbergen, AJ e Initiative, tIP. Ameaças a um serviço ecossistêmico: pressões sobre os polinizadores. *Fronteiras em Ecologia e Meio Ambiente*, 11: 251-259, 2013.
- Villas-Bôas, Jerônimo Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). Brasil, 2012.
- Ward, Laura T., et al. "Exposição a pesticidas de abelhas selvagens e abelhas melíferas que se alimentam de flores nas bordas dos campos em áreas agrícolas de manejo intensivo." *Ciência do Meio Ambiente Total* 831, 2022.