

RODRIGO CUPERTINO BERNARDES

**BIOPESTICIDA À BASE DE NIM REDUZ A  
SOBREVIVÊNCIA E PREJUDICA O DESENVOLVIMENTO  
DE RAINHAS DA ABELHA SEM FERRÃO *Partamona helleri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de  
Viçosa - Câmpus Viçosa

T

B522b  
2017  
Bernardes, Rodrigo Cupertino, 1991-  
Biopesticida à base de nim reduz a sobrevivência e prejudica o desenvolvimento de rainhas da abelha sem ferrão *Partamona helleri* / Rodrigo Cupertino Bernardes. - Viçosa, MG, 2017.  
v, 27f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : Maria Augusta Lima Siqueira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.14-22.

1. Abelhas sem ferrão. 2. Herbicidas - Toxicologia.  
3. Polinizadores. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal.  
II. Título.

CDD 22 ed. 595.799

RODRIGO CUPERTINO BERNARDES

**Biopesticida à base de nim reduz a sobrevivência e prejudica o desenvolvimento de rainhas da abelha sem ferrão *Partamona helleri***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

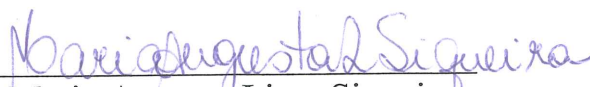
APROVADA: 14 de julho de 2017.



Gustavo Ferreira Martins



Kenner Morais Fernandes



Maria Augusta Lima Siqueira  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

Destaco aqui algumas pessoas que foram fundamentais nessa caminhada, as quais sou muito grato por terem contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais Vanderlei e Neli por todo cuidado parental. Às minhas irmãs Luale e Carol pelo carinho. Obrigado Lú e Rafael pelo meu sobrinho Davi que nos enche de felicidade.

À minha segunda família pelo apoio e reconhecimento, obrigado Ivanil, Aparecida, Demades e Tatiane, tenho muito apreço por vocês. A família aumentou com a chegada do Arthur que veio nos trazer ainda mais alegria.

Destaco meu agradecimento à minha noiva Karina, você foi fundamental para que eu iniciasse minha jornada acadêmica, sempre me incentivando e apoiando. Obrigado por compartilhar sua vida com a minha, amo você!

Agradeço imensamente a minha orientadora Maria Augusta Lima Siqueira que sempre foi muito solícita desde o início da minha graduação até o mestrado. Obrigado pela orientação, conselhos, confiança e bom convívio.

Aos Professores Raul Narciso Carvalho Guedes e Gustavo Ferreira Martins, por toda ajuda e disponibilidade oferecida.

Obrigado aos Doutores Hudson Vaner Ventura Tomé e Wagner Faria Barbosa, pela parceria. Aprendi muito com vocês.

As colegas do laboratório Vanessa, Rafaela, Raquel e Gabi pela cooperação durante o mestrado.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
1. Introdução.....	1
2. Material e métodos .....	3
2.1 Criação in vitro e exposição crônica aos pesticidas.....	3
2.2 Sobrevivência.....	5
2.3 Desenvolvimento, morfologia externa, determinação das castas e massa corporal	5
2.4 Bioensaio de locomoção .....	6
2.5 Morfometria do sistema reprodutor .....	6
2.6 Análise de dados .....	7
3. Resultados.....	8
3.1 Impacto dos pesticidas na sobrevivência .....	8
3.2 Desenvolvimento, morfologia externa, determinação das castas e massa corporal	8
3.3 Locomoção.....	9
3.4 Morfometria do sistema reprodutor .....	10
4. Discussão .....	10
5. Referências .....	14
Tabela I - .....	23
Figura 1 .....	24
Figura 2 .....	25
Figura 3 - .....	26
Figura 4 - .....	27

## RESUMO

BERNARDES, Rodrigo Cupertino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Biopesticida à base de nim reduz a sobrevivência e prejudica o desenvolvimento de rainhas da abelha sem ferrão *Partamona helleri***. Orientadora: Maria Augusta Lima Siqueira. Coorientadores: Wagner Faria Babosa e Raul Narciso Carvalho Guedes.

Reduções em populações de abelhas comprometem a manutenção dos ecossistemas e a produtividade agrícola. O uso de pesticidas sintéticos em grande escala é uma das principais ameaças à biodiversidade de abelhas, principalmente no Brasil, que é um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas e apresenta a maior biodiversidade de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini). Pesticidas de origem natural (biopesticidas) são considerados uma alternativa em relação aos sintéticos, no intuito de diminuir os impactos sobre organismos benéficos. Entretanto, biopesticidas como a azadiractina tem demonstrado efeito tóxico às abelhas sem ferrão, questionando a segurança ambiental dessas moléculas. A produção de rainhas saudáveis em ninhos de abelhas sem ferrão é fundamental para sobrevivência da colônia. Apesar disso, ainda é desconhecido se a exposição a agroquímicos pode afetar o fitness dessas rainhas. No presente estudo, os efeitos da azadiractina na sobrevivência, desenvolvimento morfológico, comportamento e reprodução de rainhas de *Partamona helleri* foram investigados. Devido aos efeitos adversos dos neonicotinoides em abelhas, o imidacloprido foi utilizado como parâmetro de alta toxicidade. As rainhas foram criadas *in vitro* e ingeriram alimento contaminado durante o desenvolvimento. A azadiractina reduziu a sobrevivência de maneira semelhante ao imidacloprido, alterou o tempo de desenvolvimento, causou deformações e reduziu o sistema reprodutor das rainhas. Portanto, a contaminação de colônias com azadiractina pode reduzir a aptidão das rainhas de abelhas sem ferrão, comprometendo a perenidade e reprodução das colônias desse importante grupo de polinizadores.

## ABSTRACT

BERNARDES, Rodrigo Cupertino, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Nim-based biopesticide reduces survival and impairs the development of stingless bee queens *Partamona helleri*.** Adviser: Maria Augusta Lima Siqueira. Co-advisers: Wagner Faria Babosa and Raul Narciso Carvalho Guedes.

Reduction in populations of bees compromises ecosystem maintenance and agricultural productivity. The use of synthetic pesticides in a large scale is a great threat to bee biodiversity, mainly in Brazil, which is one of the largest consumers of pesticides in the world and has the biggest biodiversity of stingless bees (Apidae: Meliponini). Pesticides of natural origin (biopesticides) are considered an alternative in relation to synthetic pesticides to reduce the impacts on beneficial organisms. However, biopesticides such as azadirachtin showed toxic effects on the stingless bees, questioning the environmental safety of these molecules. The production of healthy queens in stingless bees is essential for survival and reproduction of the hives. Despite this, it is still unknown whether exposure to agrochemicals can affect the fitness of these queens. In the present study, we investigated the effects of azadirachtin on the survival, morphological development, behavior and reproduction of queens of *Partamona helleri*. Due to the adverse effects of neonicotinoids on bees, imidacloprid was used as a parameter of high toxicity. The queens were reared *in vitro* and ingested contaminated diet during the development. Azadirachtin reduced survival in similarly to imidacloprid, altered developmental time, caused deformations, and reduced the reproductive system of the queens. Therefore, the contamination of colonies with azadirachtin can reduce the fitness of stingless bees queens, compromising the perenniality and reproduction of the colonies of this important group of pollinators.

## **1. Introdução**

Desde a invenção dos pesticidas orgânicos sintéticos seu uso se tornou a principal ferramenta para o controle de pragas, promovendo um grande aumento na produtividade agrícola (Casida & Quistad, 1998; Nauen & Bretschneider, 2002; Popp et al., 2013). Entretanto, os impactos à organismos benéficos, como polinizadores, é um dos grandes problemas em relação ao uso de pesticidas. O declínio de populações de abelhas têm chamado atenção e o uso de pesticida em grande escala é considerado umas das principais ameaças (Guedes et al., 2016; Kevan & Viana, 2003; Sánchez-Bayo et al., 2016; Tomé et al., 2012), sendo os neonicotinoides o grupo químico mais citado como responsável pelo declínio das abelhas (Fairbrother et al., 2014; Lima et al., 2016; Tomé et al., 2012).

O Brasil, um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas, apresenta grande biodiversidade de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) (Camargo & Pedro, 2013; Roubik, 2014). Essas abelhas mantêm a variabilidade genética da flora nativa e cultivada, contribuindo diretamente para o aumento da produtividade em muitas culturas (Flach et al., 2006; Johnson & Hubbell, 1975; Slaa et al., 2006). Portanto, se faz necessário o uso de estratégias parcimoniosas no controle de pragas que possibilitem a manutenção da saúde e a capacidade reprodutiva desse grupo de abelhas que são cruciais para a conservação dos ecossistemas e produção de alimentos.

Pesticidas de origem natural (biopesticidas) são considerados uma alternativa em relação aos sintéticos, no intuito de diminuir os impactos sobre organismos benéficos. Apesar disso, alguns estudos demonstraram efeitos letal e subletais de biopesticidas em abelhas o que questiona a segurança ambiental das moléculas de origem natural para o controle de pragas (Barbosa et al., 2015a, 2015c, Tomé et al., 2015a, 2015b).

A azadiractina é um biopesticida proveniente da árvore do nim (*Azadirachta indica*), muito utilizada e considerado seguro para a agricultura orgânica (Bernardes et al., 2017; Isman, 2006; Zehnder et al., 2007). Seus principais efeitos nos insetos são interferência no crescimento e na reprodução (Mordue (Luntz) & Blackwell, 1993; Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000). A azadiractina afeta o sistema endócrino a nível do complexo cérebro-corpora cardíaca, inibindo a liberação de neuropeptídios, que atuam na glândula protorácica e corpora allata. Isso provoca alterações nos níveis de ecdisteroïdes e hormônio juvenil (HJ), levando ao desenvolvimento anormal do inseto (Martinez & van Emden, 2001; Mordue (Luntz) & Blackwell, 1993; Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000). Azadiractina também pode afetar diretamente o tecido reprodutivo inibindo a divisão celular e a síntese proteica, afetando a oogênese e a vitelogênese (Barbosa et al., 2015a; Sayah et al., 1996).

Em Meliponini, com exceção ao gênero *Melipona*, a determinação de casta é trófica, assim, durante o desenvolvimento larval, rainhas ingerem o mesmo tipo de alimento que as operárias, porém em maior quantidade (Hartfelder et al., 2006). Dessa forma, futuras rainhas podem ser expostas às toxinas durante o desenvolvimento larval, ao consumirem grandes quantidades de pólen e néctar contaminados, coletados por operárias em plantas que foram pulverizadas com pesticidas (Lima et al., 2013; Velthuis et al., 2003).

A capacidade reprodutiva das rainhas interfere diretamente na sobrevivência das colônias e, conseqüentemente, na manutenção das populações locais (Imperatriz Fonseca et al., 1995; Naves Da Silva et al., 1972; VanEngelsdorp et al., 2013). Apesar disso, os efeitos de pesticidas sobre a reprodução de rainhas de abelhas sem ferrão são desconhecidos (Lima et al., 2016). A toxicidade de pesticidas foi estudada apenas em rainhas da espécie de abelha sem ferrão *Plebeia droryana* (Dos Santos et al., 2016), mas

ainda não existem pesquisas que avaliaram, concomitantemente, a ocorrência de vários efeitos subletais às rainhas contaminadas.

No presente trabalho, os efeitos da azadiractina na sobrevivência, desenvolvimento pós-embrionário, morfologia e no comportamento locomotor de rainhas de *Partamona helleri* foram analisados. Essa espécie de abelha sem ferrão poliniza muitas famílias de plantas no Brasil (Camargo & Pedro, 2003; Lopes De Carvalho et al., 1999). Além disso, verificamos se a azadiractina interfere na determinação de castas, modificando a proporção de rainhas formadas após a exposição. Finalmente, investigamos, pela primeira vez, se a contaminação com um agroquímico pode interferir na reprodução de abelhas sem ferrão, por meio da morfometria comparativa entre os ovários das rainhas contaminadas e não contaminadas. O imidacloprido foi utilizado como parâmetro de alta toxicidade, devido aos efeitos adversos que esse neonicotinoide demonstrou em abelhas (Lima et al., 2016; Tomé et al., 2017, 2015b, 2012).

## **2. Material e métodos**

### *2.1 Criação in vitro e exposição crônica aos pesticidas*

Cinco colônias de *P. helleri* foram coletadas na região rural de Viçosa (MG, Brasil; 20°45'S e 42°52'W). As colônias foram estabelecidas no campus da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil) e utilizadas para coleta do material biológico. A formulação comercial dos pesticidas utilizadas foi o Cursor (concentrado emulsificado a 10 g de azadiractina · L<sup>-1</sup>; BIO CARB, Curitiba, PR, Brasil) e Evidence 700 wg (grânulos dispersáveis em água a 700 g imidacloprido · L<sup>-1</sup>; Bayer CropScience, São Paulo, SP, Brasil). As doses dos pesticidas utilizadas, foram baseadas na dose recomendada para uso em campo no controle da mosca-branca

(*Bemisia tabaci*) (30 ng azadiractina ·  $\mu\text{L}^{-1}$  e 42 ng imidacloprido ·  $\mu\text{L}^{-1}$ ). Essa praga causa perdas significativas em culturas de tomate, que são potencialmente visitadas por *P. helleri* (Lopes De Carvalho et al., 1999; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017).

As rainhas de *P. helleri* foram cronicamente expostas durante o desenvolvimento pós-embrionário a doses crescentes de azadiractina (24; 48; 240 e 480 ng i.a. · abelha<sup>-1</sup>) seguindo as diluições de 1/100, 1/50, 1/10 e 1/5 da dose recomendada para o controle de *B. tabaci* em campo. Como o imidacloprido foi utilizado como parâmetro de alta toxicidade, somente a dose de 672 ng i.a. · abelha<sup>-1</sup> foi utilizada. Esta dose representa a diluição de 1/5 da dose recomendada para o controle de *B. tabaci* em campo e foi utilizada para comparação de toxicidade com a dose máxima da azadiractina utilizada aqui. Além disso, foi feito um controle (0 ng i.a. · abelha<sup>-1</sup>) com água destilada para acessar a mortalidade natural.

O método de obtenção de rainhas de *P. helleri in vitro* foi adaptado de Lima et al., (2013). Foram utilizadas placas de polipropileno de 24 poços, que tiveram os poços revestidos com cera de *Apis mellifera*, representando as células de cria artificial. O alimento larval, coletado nos favos de cria, foi misturado com os pesticidas nas diluições citadas acima e adicionado às células artificiais. Cada célula de cria artificial recebeu 80  $\mu\text{l}$  de dieta (75  $\mu\text{l}$  de alimento larval puro + 5  $\mu\text{l}$  de solução inseticida), quantidade de alimento suficiente para produção de rainhas em *P. helleri* (Campos & Coelho, 1993). Cada célula recebeu um ovo, que foi colocado em posição vertical sobre a dieta (perpendicularmente ao plano da superfície da dieta), método que permite a exposição à dieta contaminada desde o primeiro instar larval (Lima et al., 2013). A criação foi mantida dentro de câmaras de vidro a  $28 \pm 2$  °C durante todo o desenvolvimento. A umidade relativa foi mantida a  $97 \pm 3$  % até o término da

alimentação larval e a  $80 \pm 3$  % durante o resto do desenvolvimento. Após emergência, as rainhas foram mantidas individualmente em placas de Petri (7 cm de diâmetro e 1.5 cm de altura) a  $28 \pm 2$  °C e  $75 \pm 5$  % umidade relativa. As rainhas adultas foram alimentadas com uma dieta contendo 80% mel de abelhas melíferas e 20% de água destilada, fornecidas *ad libitum*. Para controle da umidade, foi utilizada uma solução saturada de NaCl.

## 2.2 Sobrevivência

Os indivíduos foram analisados diariamente para estimar a sobrevivência ao longo do desenvolvimento. Os ovos que não eclodiram e os indivíduos que não eram rainhas foram excluídos das análises ao final do experimento. Dessa forma, 577 rainhas foram amostradas (Tabela I). Os indivíduos que não apresentavam movimento respiratório ou coloração escura foram considerados mortos e descartados para evitar possíveis contaminações por fungos.

## 2.3 Desenvolvimento, morfologia externa, determinação das castas e massa corporal

Durante a avaliação diária ao longo do desenvolvimento a data de eclosão e de emergência dos indivíduos foram registradas para determinar o tempo de desenvolvimento. Sempre que alguma alteração na morfologia era observada o indivíduo era contabilizado como deformado. Pupas de aproximadamente 24 dias após eclosão foram analisadas em esteromicroscópio para verificação das castas. As rainhas foram separadas pela presença de 10 flagelômeros ausência de gonóstilo e corbícula (Michener, 1944). Rainhas adultas com 3 dias de idade, foram pesadas em balança analítica para registro da massa corporal.

#### *2.4 Bioensaio de locomoção*

Um sistema de vídeo rastreamento foi usado (ViewPoint LifeSciences, Montreal, Quebec, Canada) para registrar o caminhar individual de rainhas adultas com 3 dias de idade em uma arena (9 cm de diâmetro e 2 cm de altura), durante 10 minutos. Isso permitiu avaliar os possíveis efeitos subletais da exposição crônica aos pesticidas, em variáveis associadas ao comportamento de locomoção (velocidade de caminhar (cm/s), distância percorrida (cm), tempo parado (s) e número de paradas do inseto) (Tomé et al., 2012). 157 rainhas foram utilizadas nesse bioensaio (Tabela I). Os indivíduos deformados não foram utilizados nesse bioensaio, pois não eram capazes de se locomoverem.

#### *2.5 Morfometria do sistema reprodutor*

Dezoito rainhas adultas virgens de 3 dias de idade, mais três operárias obtidas no controle (0 ng i.a · abelha<sup>-1</sup>), foram dissecadas em solução fisiológica para insetos (0.1 M tampão fosfato a pH 7.4). Os indivíduos dissecados foram selecionados aleatoriamente entre as colônias (Tabela I). As operárias foram dissecadas para comparação do quanto os pesticidas poderiam reduzir o sistema reprodutor das rainhas. Os ovários foram imersos em etanol 70% e fotografados com uma câmera digital acoplada a um estereomicroscópio. Para mensurar a área relativa do sistema reprodutor, os ovários, juntamente com os ovidutos laterais, até o final do encontro com o oviduto comum foram mensurados usando o software Image-Pro Plus™ (MediaCybernetics, Bethesda, MD, USA) (Lisboa et al., 2005).

## 2.6 Análise de dados

A análise de sobrevivência foi realizada utilizando o pacote *survival* (Therneau, 2015) para os dados de sobrevivência e tempo de desenvolvimento. Os modelos foram construídos com distribuição Weibull e as colônias foram inseridas no modelo como efeito aleatório. Os modelos lineares generalizados (GLMs) foram ajustados para os dados de morfologia externa e proporção de rainhas obtidas, utilizando distribuição binomial (link = logit). Os modelos lineares mistos (lme) foram aplicados para os dados de massa corporal e locomoção, utilizando o pacote *nlme* (Pinheiro et al., 2016). A colônia foi inserida no modelo como efeito aleatório e quando necessário, os dados de locomoção foram transformados (log10), para satisfazer suposições de normalidade e homoscedasticidade. Os dados de morfometria do sistema reprodutor foram submetidos à regressão linear e análise de variância.

A sobredispersão em todos os GLMs foi averiguada. Quando necessário, uma distribuição quasi-binomial foi configurada para corrigir sobredispersão. Para as análises de sobrevivência e os modelos lineares mistos, a colônia foi configurada como efeito aleatório, devido às medições tomadas a partir da mesma colônia (Hendriksma et al., 2011). Para dose reposta, morfologia externa e proporção de rainhas, não foi necessário inserir a colônia como efeito aleatório, pois, como os dados são de proporção, as colônias foram consideradas como réplicas. Para mensurar a área do sistema reprodutor, 3 indivíduos foram randomicamente selecionados dentre as colônias, para cada tratamento, não sendo necessário inserir a colônia como efeito aleatório. Todos os contrastes foram feitos por simplificação gradual do modelo, agregando níveis não significativos em um procedimento *a posteriori* (Crawley, 2012). Os tratamentos com os pesticidas foram considerados como variáveis explicativas em todos os modelos. Os resíduos foram checados para verificar a adequação da

distribuição em todos os modelos. Todas as análises foram conduzidas no software R (R Core Team, 2016).

### 3. Resultados

#### 3.1 Impacto dos pesticidas na sobrevivência

A ingestão de dieta contaminada reduziu a sobrevivência das rainhas de *P. helleri* ( $\chi^2 = 55,1$ ; g.l. = 7;  $p < 0,001$ ; Fig. 1). A sobrevivência no controle (0 ng i.a. · rainha<sup>-1</sup>) foi de 86%, semelhante aos tratamentos com 24 e 48 ng azadiractina · abelha<sup>-1</sup> (91,3% e 86,4%, respectivamente) ( $\chi^2 = 0,3$ ; g.l. = 1;  $p = 0,6$ ). As doses de 240, 480 ng azadiractina · rainha<sup>-1</sup> e 672 ng imidacloprido · rainha<sup>-1</sup>, apresentaram menor sobrevivência (63,7%; 71,1% e 73,2%, respectivamente) ( $\chi^2 = 35,2$ ; g.l. = 1;  $p < 0,001$ ) e não houve diferença significativa entre elas ( $\chi^2 = 1,2$ ; g.l. = 1;  $p = 0,29$ ) (Fig. 1).

#### 3.2 Desenvolvimento, morfologia externa, determinação das castas e massa corporal

O tempo de desenvolvimento das rainhas de *P. helleri* foi significativamente afetado ( $\chi^2 = 67,3$ ; g.l. = 8;  $p < 0,001$ ; Fig. 2A). Rainhas do tratamento com 480 ng azadiractina · abelha<sup>-1</sup>, apresentaram um atraso no tempo de desenvolvimento em relação aos outros tratamentos ( $\chi^2 = 37,8$ ; g.l. = 1;  $p < 0,001$ ). Não houve diferença significativa entre os outros tratamentos ( $\chi^2 = 5,3$ ; g.l. = 4;  $p = 0,3$ ). O tempo médio de desenvolvimento na dose de 480 ng foi  $38,41 \pm 0,42$  (média  $\pm$  SE) dias e para os outros tratamentos, incluindo imidacloprido, foi  $37,41 \pm 0,26$  (média  $\pm$  SE) dias, portanto a maior dose de azadiractina atrasou em 1 dia o desenvolvimento das rainhas em relação aos outros tratamentos.

Houve um aumento significativo na proporção de indivíduos deformados após o tratamento ( $\chi^2 = 23$ ; g.l. = 23;  $p = 0,003$ ; Fig. 2B). A proporção de indivíduos

deformados aumentou de  $0,15 \pm 0,05$  para  $0,31 \pm 0,08$  (média  $\pm$  SE), seguindo o aumento crescente das doses de azadiractina (de 0 a 480 ng i.a.  $\cdot$  abelha<sup>-1</sup>). O tratamento com imidacloprido não apresentou diferença significativa em relação ao controle ( $F_{1; 8} = 0,52$ ;  $p = 0,49$ ), com a proporção de indivíduos deformados igual a  $0,15 \pm 0,09$  (média  $\pm$  SE). As rainhas deformadas apresentaram antenas, mandíbulas, pernas e asas contorcidas (Fig. 3). Dentre as pupas que apresentaram deformações  $58,5\% \pm 4,4$  ( $\pm$  SE) chegaram à fase adulta, mas a maioria não foi capaz de caminhar e ingerir alimento.

Não houve diferença significativa na proporção de rainhas produzidas entre os tratamentos ( $F_{1; 23} = 0,15$ ;  $p = 0,7$ ; azadiractina |  $F_{1; 8} = 0,51$ ;  $p = 0,5$ ; imidacloprido). Foi produzido em média 3,34% de operárias e 1,6% de zangões em cada tratamento.

A massa corporal não foi afetada pela ingestão de doses crescentes de azadiractina ( $F_{1; 135} = 1,94$ ;  $p = 0,17$ ). Rainhas que ingeriram dieta não contaminada, pesaram  $23,91 \pm 0,47$  mg (média  $\pm$  SE). Rainhas que ingeriram as doses de 24 a 480 ng azadiractina  $\cdot$  abelha<sup>-1</sup>, pesaram  $24,07 \pm 0,53$  mg. O tratamento com imidacloprido reduziu, significativamente, a massa corporal das rainhas ( $F_{1; 62} = 64,43$ ;  $p < 0,001$ ) ( $18,69 \pm 0,48$  mg).

### 3.3 Locomoção

A azadiractina não afetou nenhuma variável associada ao comportamento de locomoção dos indivíduos sobreviventes até a fase adulta e não deformados (velocidade;  $F_{1; 123} = 0,1$ ;  $p = 0,76$  | distância caminhada;  $F_{1; 123} = 0,8$ ;  $p = 0,79$  | tempo parado;  $F_{1; 123} = 1,8$ ;  $p = 0,2$  | número de paradas;  $F_{1; 123} = 2,4$ ;  $p = 0,1$ ). O mesmo ocorreu para o imidacloprido (velocidade;  $F_{1; 26} = 0,2$ ;  $p = 0,69$  | distância caminhada;  $F_{1; 26} = 0,2$ ;  $p = 0,66$  | tempo parado;  $F_{1; 26} = 0,1$ ;  $p = 0,7$  | número de paradas;  $F_{1; 26} = 0,8$ ,  $p = 0,37$ ). Os valores médios ( $\pm$  SE) foram  $1,27 \pm 0,09$  cm/s (velocidade);  $617,2 \pm$

62,7 cm (distância caminhada);  $168 \pm 28$  s (tempo parado) e  $656,6 \pm 65$  (número de paradas).

### 3.4 Morfometria do sistema reprodutor

Houve uma redução significativa na área mensurada do sistema reprodutor de rainhas virgens com 3 dias de idade, devido à ingestão de azadiractina durante o desenvolvimento pós-embrionário ( $F_{1; 14} = 34,2$ ;  $p < 0,001$ ; Fig. 4). A área mensurada do sistema reprodutor correspondente a cada tratamento foi de  $2,56 \text{ mm}^2 \pm 0,07$ ; 0 ng azadiractina  $\cdot \text{abelha}^{-1}$  |  $2,73 \text{ mm}^2 \pm 0,1$ ; 24 ng azadiractina  $\cdot \text{abelha}^{-1}$  |  $2,59 \text{ mm}^2 \pm 0,18$ ; 48 ng azadiractina  $\cdot \text{abelha}^{-1}$  |  $1,9 \text{ mm}^2 \pm 0,05$ ; 240 ng azadiractina  $\cdot \text{abelha}^{-1}$  |  $1,76 \text{ mm}^2 \pm 0,14$ ; 480 ng azadiractina  $\cdot \text{abelha}^{-1}$  (média  $\pm$  SE). No tratamento com imidacloprido não houve efeito significativo no sistema reprodutor ( $F_{1; 6} = 1,1$ ;  $p = 0,3$ ), com área mensurada de  $2,28 \text{ mm}^2 \pm 0,13$  (média  $\pm$  SE). A área mensurada do sistema reprodutor de operárias adultas com 3 dias de idade foi  $0,73 \text{ mm}^2 \pm 0,3$  (média  $\pm$  SE).

## 4. Discussão

Os resultados desse estudo demonstram, pela primeira vez, que a intoxicação com um agroquímico, supostamente pouco tóxico aos insetos benéficos, aumenta a mortalidade, causa vários efeitos subletais e reduz o sistema reprodutor de rainhas de *P. helleri*. Também foi demonstrado que a ingestão crônica de dieta contaminada com azadiractina ou imidacloprido provoca semelhantes taxas de mortalidade e a maior gama de efeitos subletais está associada ao consumo da azadiractina e não do imidacloprido.

A sobrevivência obtida nos tratamentos com azadiractina foi semelhante ao ocorrido com outras espécies de abelhas, que também não apresentaram alta mortalidade em doses próximas às utilizadas aqui (Barbosa et al., 2015a, 2015c). Por

isso, foi esperado que os impactos da azadiractina estivessem relacionados aos efeitos subletais, ocasionados por distúrbios hormonais, como têm sido reportado em abelhas (Barbosa et al., 2015a, 2015c; Bernardes et al., 2017; Lima et al., 2016; Tomé et al., 2015a). O atraso no desenvolvimento, aumento de indivíduos deformados e redução do sistema reprodutor de *P. helleri*, provavelmente estão associados aos efeitos fisiológicos da azadiractina nos insetos, que incluem alterações nos níveis de ecdisteroides e hormônio juvenil (HJ), levando ao desenvolvimento anormal, além de afetar a oogênese e a vitelogênese (Barbosa et al., 2015a; Martinez & van Emden, 2001; Mordue (Luntz) & Blackwell, 1993; Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000; Sayah et al., 1996).

O que ocorreu de atípico foi a alta taxa de sobrevivência que as rainhas apresentaram ao imidacloprido. Alta toxicidade do imidacloprido têm sido amplamente demonstrada em abelhas (Soares et al., 2015; Tomé et al., 2017; Valdovinos-Núñez et al., 2009; van der Sluijs et al., 2013). Operárias de *Melipona quadrifasciata* que ingeriram dieta contaminada com 56 ng imidacloprido  $\cdot$  abelha<sup>-1</sup>, apresentaram mais de 80% de mortalidade (Tomé et al., 2012), enquanto aqui, as rainhas que ingeriram uma dose 12 vezes maior (672 ng imidacloprido  $\cdot$  abelha<sup>-1</sup>), apresentaram mortalidade de cerca de 30%. Dessa forma, a dose do imidacloprido utilizada aqui deveria ser altamente tóxica para rainhas de *P. helleri*, havendo 100% de mortalidade ao longo do desenvolvimento, sem o registro de efeitos subletais nos adultos. Apesar disso, o imidacloprido afetou a massa corporal das rainhas. Como os neonicotinoides são agonista de receptores de acetilcolina (Buckingham et al., 1997; Magesh et al., 2017; Nauen & Bretschneider, 2002), o metabolismo das rainhas expostas ao imidacloprido pode ter sido mais alto do que os das rainhas dos outros tratamentos, devido a superexcitação do sistema nervoso, acarretando em menor massa corporal. Além disso, provavelmente esses indivíduos investiram muita energia em processos de

detoxificação. Mecanismos de detoxificação, estão associados com o aumento da demanda energética, as custas do catabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Gong & Diao, 2017; Rand et al., 2015). Investigações nos mecanismos envolvidos na desintoxicação de xenobióticos em abelhas da Tribo Apini demonstraram que o genoma dessas abelhas é caracterizado por uma escassez de genes associados à detoxificação (Berenbaum & Johnson, 2015; Magesh et al., 2017). Entretanto, é pouco conhecido sobre o mecanismo de detoxificação em abelhas sem ferrão, havendo uma necessidade por estudos que avaliem aspectos da toxicocinética de xenobióticos nessas abelhas.

Nenhum dos pesticidas utilizados aqui afetou a proporção da produção de rainhas, diferentemente do que foi demonstrado para a abelha sem ferrão *Plebeia droryana*, após exposição crônica ao inseticida organofosforado clorpirifós (Dos Santos et al., 2016). Organofosforados são inibidores de acetilcolinesterase e não apresentam ação direta em hormônios (Fukuto, 1990), responsáveis pela diferenciação de castas em abelhas sem ferrão (Hartfelder et al., 2006; Hartfelder & Rembold, 1991). Assim, em *P. droryana*, a redução na produção de rainhas foi consequência das larvas não terem ingerido todo o alimento nas maiores doses (Dos Santos et al., 2016). Isso não ocorreu em nosso trabalho, pois não foi observado restos de alimento nas células em nenhum dos tratamentos.

O principal impacto da azadiractina está relacionado ao desenvolvimento dos insetos e não necessariamente à mobilidade (Mordue (Luntz), 2004; Mordue (Luntz) & Blackwell, 1993; Mordue (Luntz) & Nisbet, 2000). Por isso, com exceção dos indivíduos deformados, que foram incapazes de se locomoverem, a azadiractina não afetou a locomoção das rainhas de *P. helleri* e nem de operárias de *M. quadrifasciata* (Barbosa et al., 2015c). Esperávamos, entretanto, que o imidacloprido afetasse a locomoção, devido à sua ação neurotóxica que prejudica o desenvolvimento de regiões

do cérebro relacionadas ao processamento e integração de informações (Buckingham et al., 1997; Déglise et al., 2002; Tomé et al., 2012). Porém, a locomoção das rainhas não foi afetada pelo imidacloprido, reforçando que rainhas de *P. helleri* são muito tolerantes a esse pesticida.

Apesar da tolerância ao imidacloprido, rainhas de *P. helleri* foram tão suscetíveis à azadiractina como operárias dessa e de outras espécies de abelhas sem ferrão (Barbosa et al., 2015c; Lima et al., 2016; Tomé et al., 2015a). Embora a formação de rainhas não tenha sido afetada, não sabemos se as rainhas de *P. helleri* produzidas seriam viáveis, pois a azadiractina reduziu o seu sistema reprodutivo, fundamental para a manutenção e reprodução da colônia (Dixon et al., 2014; Imperatriz Fonseca et al., 1995; VanEngelsdorp et al., 2013). Portanto, é necessária mais atenção na utilização de produtos à base de nim, considerados seguros para cultivos orgânicos (Isman, 2006; Zehnder et al., 2007).

Este é um dos estudos pioneiros com relação aos impactos de pesticidas em rainhas de abelhas sem ferrão, sendo o primeiro a avaliar a toxicidade de um biopesticida e a comprovar prejuízos causados ao sistema reprodutor em consequência da intoxicação. Como ingerem grandes quantidades de pólen e néctar, que podem estar contaminados, supomos que rainhas de abelhas sem ferrão sejam mais expostas à ingestão de pesticidas do que rainhas de abelhas melíferas, que são nutridas com geleia real, alimento glandular produzido pelas operárias (Hartfelder et al., 2006; Hartfelder & Engels, 1989; Haydak, 1970). Essas informações, juntamente com os nossos resultados, reforçam a ideia de que o uso de abelhas melíferas como espécie modelo para análise de risco e o maior enfoque em ensaios com neonicotinoides devem ser ampliados para outras espécies, para gerar informações que subsidiem estratégias conservacionistas para os polinizadores (Bahlai et al., 2010; Barbosa et al., 2015b; Guedes et al., 2016).

Enfatizamos também, a necessidade de estudos ecotoxicológicos em campo, para melhor compreensão do real papel dos pesticidas no declínio de abelhas. Diante dos potenciais impactos dos pesticidas, essas substâncias devem ser utilizadas de forma a minimizar a contaminação de abelhas, e seu uso deve ser associado a métodos alternativos para o controle de pragas.

## 5. Referências

Bahlai, C.A., Xue, Y., McCreary, C.M., Schaafsma, A.W., Hallett, R.H., 2010.

Choosing organic pesticides over synthetic pesticides may not effectively mitigate environmental risk in soybeans. PLoS One 5, e11250.

doi:10.1371/journal.pone.0011250

Barbosa, W.F., De Meyer, L., Guedes, R.N.C., Smagghe, G., 2015a. Lethal and

sublethal effects of azadirachtin on the bumblebee *Bombus terrestris*

(Hymenoptera: Apidae). Ecotoxicology 24, 130–142. doi:10.1007/s10646-014-1365-9

Barbosa, W.F., Smagghe, G., Guedes, R.N.C., 2015b. Pesticides and reduced-risk

insecticides, native bees and pantropical stingless bees: pitfalls and perspectives.

Pest Manag. Sci. 34, 2149–2158. doi:10.1002/ps.4025

Barbosa, W.F., Tomé, H.V.V., Bernardes, R.C., Siqueira, M.A.L., Smagghe, G.,

Guedes, R.N.C., 2015c. Biopesticide-induced behavioral and morphological

alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. Environ. Toxicol. Chem.

34, 2149–2158. doi:10.1002/etc.3053

Berenbaum, M.R., Johnson, R.M., 2015. Xenobiotic detoxification pathways in honey

bees. Curr. Opin. Insect Sci. 10, 51–58. doi:10.1016/j.cois.2015.03.005

Bernardes, R.C., Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Guedes, R.N.C., Lima, M.A.P., 2017.

- Azadirachtin-induced antifeeding in Neotropical stingless bees. *Apidologie* 48, 275–285. doi:10.1007/s13592-016-0473-3
- Buckingham, S., Lapied, B., Corronc, H., Sattelle, F., 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J. Exp. Biol.* 200, 2685–2692.
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2013. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical region [WWW Document]. URL <http://www.moure.cria.org.br/catalogue> (accessado 10/07/17).
- Camargo, J.M.F., Pedro, S.R.M., 2003. Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae)—bionomia e biogeografia. *Rev. Bras. Entomol.* 47, 311–372. doi:10.1590/S0085-56262003000300001
- Campos, L.A.O., Coelho, C.D.P., 1993. Determinação de sexo em abelhas. XXX. Influência da quantidade de alimento e do hormônio juvenil na determinação das castas em *Partamona cupira helleri* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Rev. Bras. Zool.* 10, 449–452. doi:10.1590/S0101-81751993000300012
- Casida, J.E., Quistad, G.B., 1998. Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu. Rev. Entomol.* 43, 1–16. doi:10.1146/annurev.ento.43.1.1
- Crawley, M.J., 2012. *The R book*, 2<sup>o</sup>. ed. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Déglise, P., Grünewald, B., Gauthier, M., 2002. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neuroscience Letters*. doi:10.1016/S0304-3940(01)02400-4
- Dixon, L., Kuster, R., Rueppell, O., 2014. Reproduction, social behavior, and aging

- trajectories in honeybee workers. *Age (Omaha)*. 36, 89–101. doi:10.1007/s11357-013-9546-7
- Dos Santos, C.F., Acosta, A.L., Dorneles, A.L., dos Santos, P.D.S., Blochtein, B., 2016. Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. *Sci. Rep.* 6, 31605. doi:10.1038/srep31605
- Fairbrother, A., Purdy, J., Anderson, T., Fell, R., 2014. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 719–731. doi:10.1002/etc.2527
- Flach, A., Marsaioli, A.J., Singer, R.B., Amaral, M.D.C.E., Menezes, C., Kerr, W.E., Batista-Pereira, L.G., Corrêa, A.G., 2006. Pollination by sexual mimicry in *Mormolyca ringens*: A floral chemistry that remarkably matches the pheromones of virgin queens of *Scaptotrigona* sp. *J. Chem. Ecol.* 32, 59–70. doi:10.1007/s10886-006-9351-1
- Fukuto, T.R., 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ. Health Perspect.* 87, 245–54.
- Gong, Y., Diao, Q., 2017. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology* 26, 1–12. doi:10.1007/s10646-016-1742-7
- Guedes, R.N.C., Smagghe, G., Stark, J.D., Desneux, N., 2016. Pesticide-induced stress in arthropod pests for optimized integrated pest management programs. *Annu. Rev. Entomol.* 61, 43–62. doi:10.1146/annurev-ento-010715-023646
- Hartfelder, K., Engels, W., 1989. The composition of larval food in stingless bees: evaluating nutritional balance by chemosystematic methods. *Insectes Soc.* 36, 1–

14. doi:10.1007/BF02225876

Hartfelder, K., Makert, G.R., Judice, C.C., Pereira, G.A.G., Santana, W.C., Dallacqua, R., Bitondi, M.M.G., 2006. Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees. *Apidologie* 37, 144–163. doi:10.1051/apido:2006013

Hartfelder, K., Rembold, H., 1991. Caste-specific modulation of juvenile hormone III content and ecdysteroid titer in postembryonic development of the stingless bee, *Scaptotrigona postica depilis*. *J. Comp. Physiol. B* 160, 617–620.  
doi:10.1007/BF00571258

Haydak, M.H., 1970. Honey bee nutrition. *Annu. Rev. Entomol.* 15, 143–156.  
doi:10.1146/annurev.en.15.010170.001043

Hendriksma, H.P., Härtel, S., Steffan-Dewenter, I., 2011. Honey bee risk assessment: new approaches for *in vitro* larvae rearing and data analyses. *Methods Ecol. Evol.* 2, 509–517. doi:10.1111/j.2041-210X.2011.00099.x

Imperatriz Fonseca, V.L., Zucchi, R., Virgin, R.Z., 1995. Virgin queens in stingless bee ( Apidae , Meliponinae ) colonies : a review. *Apidologie* 26, 231–244.  
doi:10.1051/apido:19950305

Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 45–66.  
doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151146

Johnson, L.K., Hubbell, S.P., 1975. Contrasting foraging strategies and coexistence of two bee species on a single resource. *Ecology* 56, 1398–1406.  
doi:10.2307/1934706

- Kevan, P.G., Viana, B.F., 2003. The global decline of pollination services. *Biodiversity* 4, 3–8. doi:10.1080/14888386.2003.9712703
- Lima, M.A.P., Martins, G.F., Oliveira, E.E., 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *J. Comp.* doi:10.1007/s00359-016-1110-3
- Lima, M.A.P., Pires, C.S.S., Guedes, R.N.C., Campos, L.A.O., 2013. Lack of lethal and sublethal effects of Cry1Ac Bt-toxin on larvae of the stingless bee *Trigona spinipes*. *Apidologie* 44, 21–28. doi:10.1007/s13592-012-0151-z
- Lisboa, L.C.O., Serrão, J.E., Cruz-Landim, C., Campos, L.A.O., 2005. Effect of larval food amount on ovariole development in queens of *Trigona spinipes* (Hymenoptera, Apinae). *J. Vet. Med. Ser. C Anat. Histol. Embryol.* 34, 179–184. doi:10.1111/j.1439-0264.2005.00591.x
- Lopes De Carvalho, C.A., Marchini, L.C., Benites Ros, P., 1999. Pollen sources used by *Apis mellifera* L. and Trigonini (Apidae) species in Piracicaba, State of Sao Paulo, Brazil. *Bragantia* 58. doi:10.1590/S0006-87051999000100007
- Magesh, V., Zhu, Z., Tang, T., Chen, S., Li, L., Wang, L., Varma, K.K., Wu, Y., 2017. Toxicity of neonicotinoids to honey bees and detoxification mechanism in honey bees. *IOSR J. Environ. Sci. Ver. I* 11, 2319–2399. doi:10.9790/2402-110401102110
- Martinez, S.S., van Emden, H.F., 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by Azadirachtin. *Neotrop. Entomol.* 30, 113–125. doi:10.1590/S1519-566X2001000100017

- Michener, C.D., 1944. Comparative external morphology, phylogeny, and a classification of the bees (Hymenoptera). *Bull. Am. Museum Nat. Hist.* 82, 1–326.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [WWW Document], 2017. URL [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) (accessado 12/03/17).
- Mordue (Luntz), A.J., 2004. Present concepts of the mode of action of azadirachtin from neem, in: neem: today and in the new millennium. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 229–242. doi:10.1007/1-4020-2596-3\_11
- Mordue (Luntz), A.J., Blackwell, A., 1993. Azadirachtin: an update. *J. Insect Physiol.* doi:10.1016/0022-1910(93)90001-8
- Mordue (Luntz), A.J., Nisbet, A.J., 2000. Azadirachtin from the neem tree *Azadirachta indica*: its action against insects. *An. da Soc. Entomológica do Bras.* 29, 615–632. doi:10.1590/S0301-80592000000400001
- Nauen, R., Bretschneider, T., 2002. New modes of action of insecticides. *Pestic. Outlook* 13, 241–245. doi:10.1039/b211171n
- Naves Da Silva, D.L., Zucchi, R., Kerr, W.E., 1972. Biological and behavioural aspects of the reproduction in some species of *Melipona* (hymenoptera, apidae, meliponinae). *Anim. Behav.* 20, 123–132. doi:10.1016/S0003-3472(72)80182-9
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team, 2016. nlme: linear and nonlinear mixed effects models.
- Popp, J., Pető, K., Nagy, J., 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33, 243–255. doi:10.1007/s13593-012-0105-x
- R Core Team, 2016. R: A language and environment for statistical computing.

- Rand, E.E. du, Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C.W.W., Nicolson, S.W., 2015. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci. Rep.* 5, 11779. doi:10.1038/srep11779
- Roubik, D.W., 2014. Pollinator safety in agriculture. FAO, Rome, Italy.
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N., 2016. Are bee diseases linked to pesticides? A brief review. *Environ. Int.* 89–90, 7–11. doi:10.1016/j.envint.2016.01.009
- Sayah, F., Fayet, C., Idaomar, M., Karlinsky, A., 1996. Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labidura riparia* (Insect Dermaptera). *Tissue Cell* 28, 741–749. doi:10.1016/S0040-8166(96)80077-2
- Slaa, E.J., Sánchez Chaves, L.A., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E., 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie* 37, 293–315. doi:10.1051/apido:2006022
- Soares, H.M., Jacob, C.R.O., Carvalho, S.M., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2015. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 675–680. doi:10.1007/s00128-015-1488-6
- Therneau, T., 2015. A package for survival analysis in S. version 2.38.
- Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Corrêa, A.S., Gontijo, L.M., Martins, G.F., Guedes, R.N.C., 2015a. Reduced- risk insecticides in Neotropical stingless bee species: impact on survival and activity. *Ann. Appl. Biol.* 167, 186–196. doi:10.1111/aab.12217
- Tomé, H.V.V., Barbosa, W.F., Martins, G.F., Guedes, R.N.C., 2015b. Spinosad in the

native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. *Chemosphere* 124, 103–109.

doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.038

Tomé, H.V.V., Martins, G.F., Lima, M.A.P., Campos, L.A.O., Guedes, R.N.C., 2012.

Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS One* 7, e38406.

doi:10.1371/journal.pone.0038406

Tomé, H.V.V., Ramos, G.S., Araújo, M.F., Santana, W.C., Santos, G.R., Guedes,

R.N.C., Maciel, C.D., Newland, P.L., Oliveira, E.E., 2017. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. *R. Soc. Open Sci.* 4, 160866. doi:10.1098/rsos.160866

doi:10.1098/rsos.160866

Valdovinos-Núñez, G.R., Quezada-Euán, J.J.G., Ancona-Xiu, P., Moo-Valle, H.,

Carmona, A., Ruiz Sanchez, E., 2009. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *J. Econ. Entomol.* 102, 1737–

42. doi:10.1603/029.102.0502

van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.-M.,

Belzunces, L.P., 2013. Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 5, 293–305.

doi:10.1016/j.cosust.2013.05.007

VanEngelsdorp, D., Tarpay, D.R., Lengerich, E.J., Pettis, J.S., 2013. Idiopathic brood

disease syndrome and queen events as precursors of colony mortality in migratory beekeeping operations in the eastern United States. *Prev. Vet. Med.* 108, 225–233.

doi:10.1016/j.prevetmed.2012.08.004

Velthuis, H.H.W., Laurino, M.C., Pereboom, Z., Imperatriz Fonseca, V.L., 2003.

Speciation, development, and the conservative egg of the stingless bee genus  
*Melipona*. Proc. Sect. Exp. Appl. Entomol. Netherlands 14, 53–57.

Zehnder, G., Gurr, G.M., Kühne, S., Wade, M.R., Wratten, S.D., Wyss, E., 2007.  
Arthropod pest management in organic crops. Annu. Rev. Entomol. 52, 57–80.  
doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091337

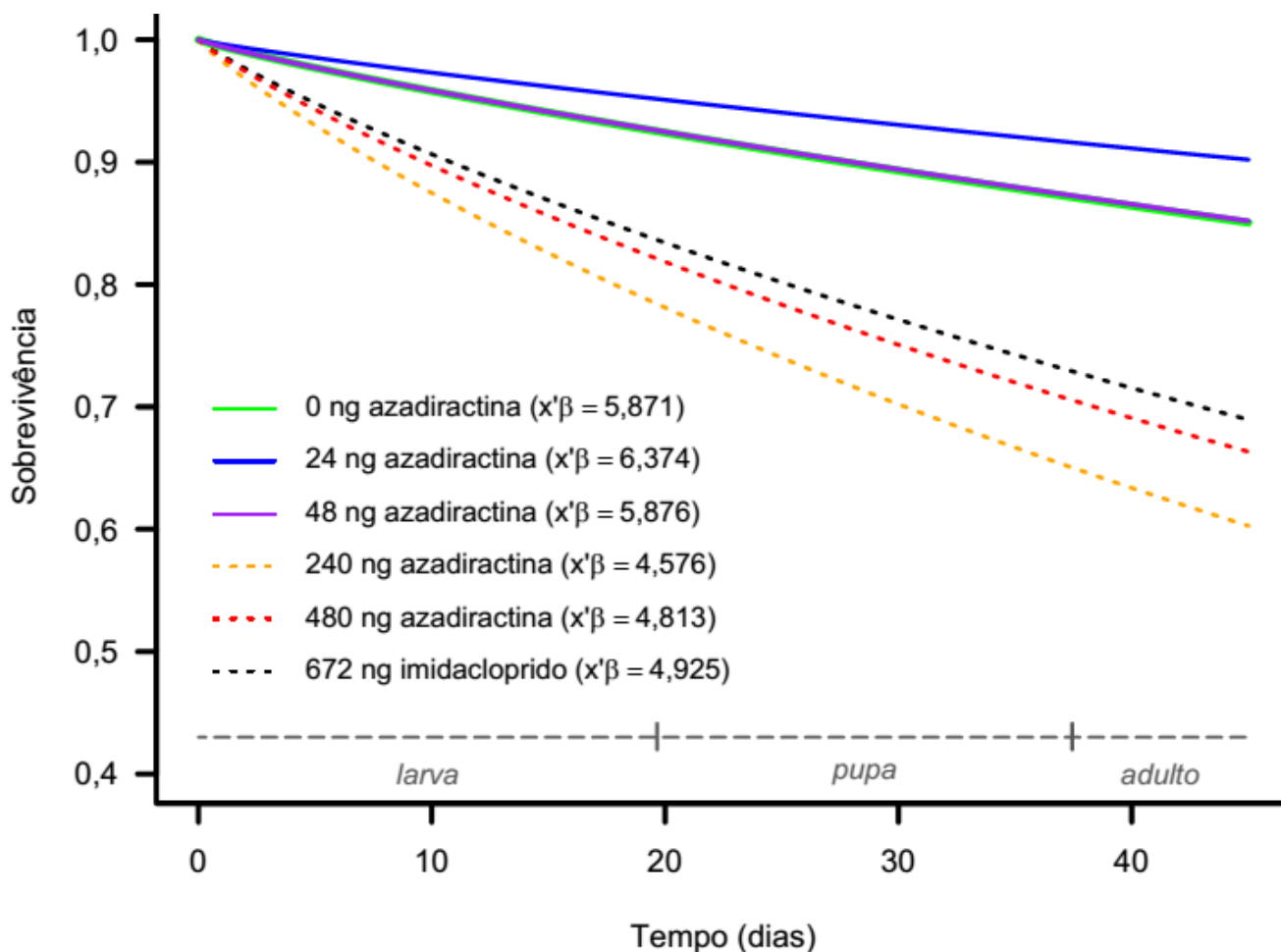
**Tabela I** - Número de indivíduos utilizados nos bioensaios.

Bioensaios	Doses	Seleção aleatória entre as colônias**	Colônias*				
			1	3	4	6	7
Sobrevivência	0 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	18	15	29	15	12
	24 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	31	15	30	14	15
	48 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	25	15	28	15	15
	240 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	26	15	30	13	7
	480 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	28	15	24	15	15
	672 ng imidacloprido · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	29	15	31	12	10
Locomoção	0 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	8	9	13	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	24 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	11	10	11	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	48 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	6	10	5	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	240 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	9	7	10	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	480 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	9	7	2	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	672 ng imidacloprido · rainha <sup>-1</sup>	<input type="checkbox"/>	11	11	8	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sistema reprodutor	0 ng azadiractina · operária <sup>-1</sup>	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	0 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	24 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	48 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	240 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	480 ng azadiractina · rainha <sup>-1</sup>	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	672 ng imidacloprido · rainha <sup>-1</sup>	3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

\* As colônias foram categoricamente identificadas por números.

\*\* A mensuração do sistema reprodutor foi realizada de maneira aleatória entre as colônias. Por isso, a origem da colônia não foi identificada.

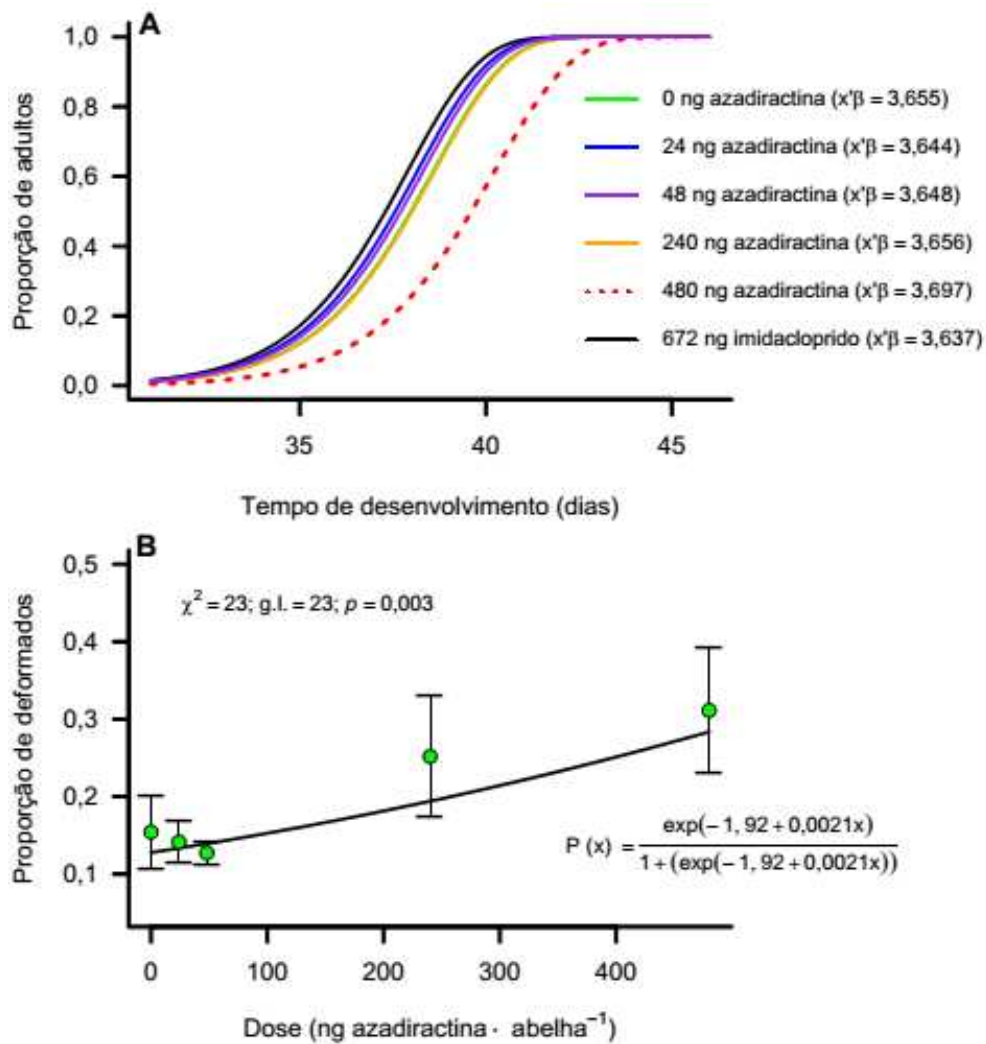
Não houve indivíduo amostrado.



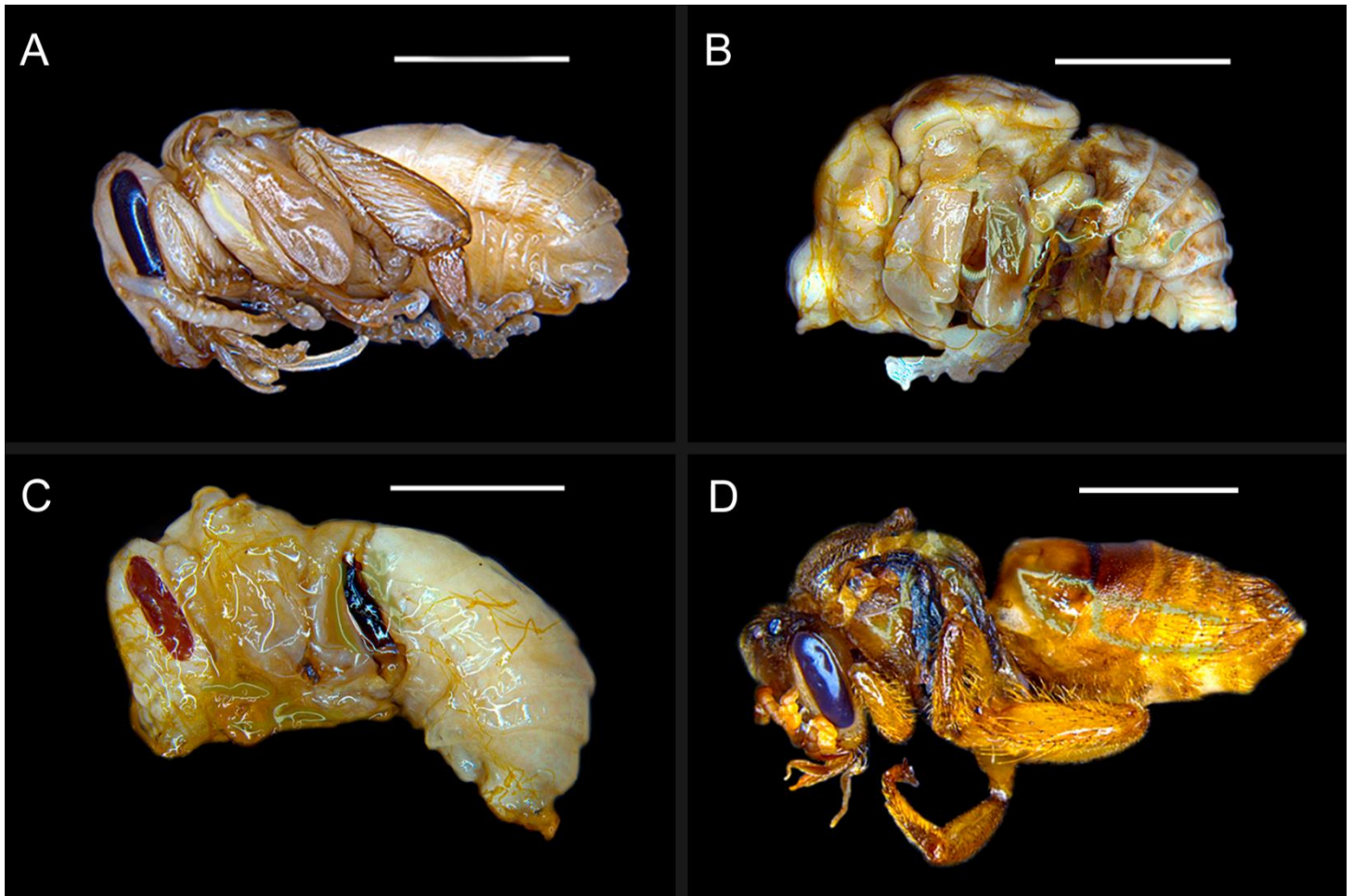
**Figura 1** - Sobrevivência das rainhas de *Partamona helleri* criadas *in vitro* com dieta contaminada com azadiractina e imidacloprido. Curvas codificadas com diferentes tipos de linha foram significativamente diferentes, de acordo com os contrastes por simplificação gradual do modelo ( $p < 0,05$ ). Na legenda está representando cada dose seguida pelo valor de  $x'\beta$ , de acordo com a função de sobrevivência Weibull

$$S(t | x) = \exp \left\{ - \left( \frac{t}{\exp(x'\beta)} \right)^{1,13} \right\}, \text{ onde } S \text{ é a probabilidade de sobrevivência, } t \text{ é o}$$

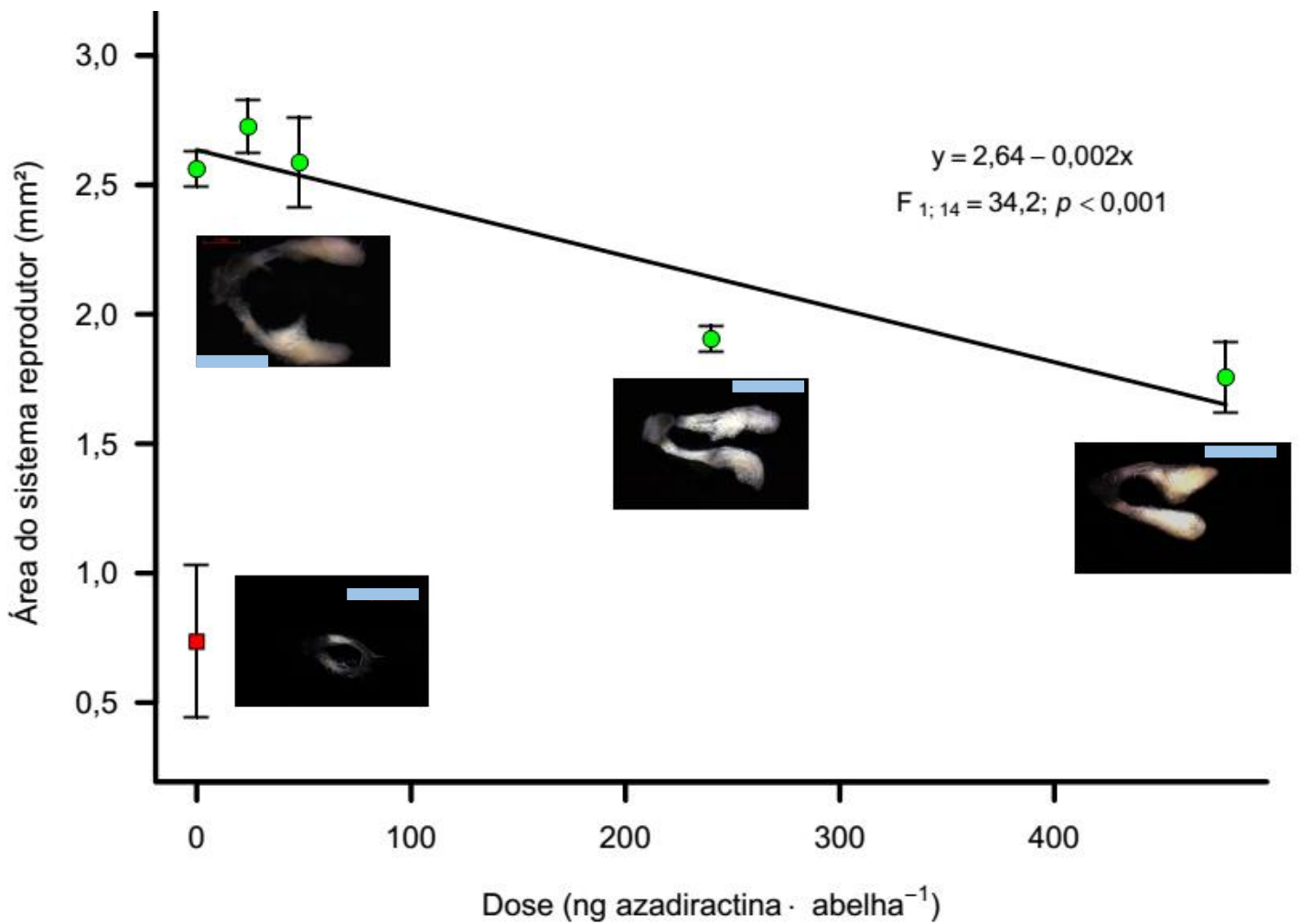
tempo em dias e  $x$  é a dose do pesticida ( $\text{ng i.a.} \cdot \text{abelha}^{-1}$ ).



**Figura 2** - Desenvolvimento das rainhas de *Partamona helleri* criadas com dieta contaminada com azadiractina e imidacloprido (A) e pupas deformadas dentre as pupas sobreviventes de *Partamona helleri* criadas com dieta contaminada com azadiractina (B). (A) Curvas codificadas com diferentes tipos de linha foram significativamente diferentes, de acordo com os contrastes por simplificação gradual do modelo ( $p < 0,05$ ). Na legenda está representando cada dose seguida pelo valor de  $x'\beta$ , de acordo com a função de sobrevivência Weibull  $S(t|x) = \exp\left\{-\left(\frac{t}{\exp(x'\beta)}\right)^{0,049}\right\}$ , onde  $S$  é a probabilidade de sobrevivência,  $t$  é o tempo em dias e  $x$  é a dose do pesticida (ng i.a. · abelha<sup>-1</sup>). (B) Os símbolos representam média e as barras verticais representam erro padrão (SE)



**Figura 3** - Rainhas de *Partamona helleri* após a ingestão de dieta controle ( $0 \text{ ng i.a.} \cdot \text{ rainha}^{-1}$ ) ou contaminada com azadiractina durante o desenvolvimento pós-embriônico. (A) Pupa de 33 dias do controle apresentando apêndices normais. (B) Pupa de 20 dias sem a cabeça, após tratamento com azadiractina. (C) Pupa de 27 dias tratada com azadiractina e que ficou enrolada na seda produzida no início da fase de pupa. (D) Rainha adulta (0 dia) tratada com azadiractina apresentando apêndices deformados (antenas, pernas e asas). Barra branca = 2 mm.



**Figura 4** - Morfometria do sistema reprodutor das rainhas de *Partamona helleri* criadas com dieta contaminada com azadiractina. Os círculos verdes representam os dados de rainhas (médias  $\pm$  erro padrão) e o quadrado vermelho representa os dados de operárias, inseridos para comparação. As imagens ilustram o padrão de sistema reprodutor obtido em cada tratamento. Barra azul = 2 mm.