

ANDREZA RIBAS BARBOSA

SUSCETIBILIDADE DE ABELHAS SEM FERRÃO AO INSETICIDA DIMETOATO

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

Orientador: Gustavo Ferreira Martins

Coorientadores: Lorena Lisbetd Botina Jojoa
Renan dos Santos Araújo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa

T

B238s
2023

Barbosa, Andreza Ribas, 1995-
Suscetibilidade de abelhas sem ferrão ao inseticida dimetoato /
Andreza Ribas Barbosa. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (40 f.): il.

Inclui apêndices.

Orientador: Gustavo Ferreira Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Geral, 2023.

Referências bibliográficas: f. 27-31.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.669>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Abelhas sem ferrão - Efeito dos inseticidas. 2. Teste de toxicidade. I. Martins, Gustavo Ferreira, 1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.799


ANDREZA RIBAS BARBOSA

SUSCETIBILIDADE DE ABELHAS SEM FERRÃO AO INSETICIDA DIMETOATO


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

APROVADA: 28 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **ANDREZA RIBAS BARBOSA**
Data: 01/11/2023 17:06:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Andreza Ribas Barbosa
Autora

Documento assinado digitalmente
 **GUSTAVO FERREIRA MARTINS**
Data: 01/11/2023 18:25:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Gustavo Ferreira Martins
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, por possibilitar minha formação e realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

Ao meu Orientador Gustavo, expresse minha profunda gratidão pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação. Foi uma honra fazer parte do laboratório e envolver-me em um projeto tão promissor.

Aos meus coorientadores Lisbetd e Renan, manifesto minha sincera gratidão pelo apoio e orientação imprescindíveis neste projeto. Suas respectivas contribuições foram fundamentais.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, agradeço a estrutura e auxílio nesse projeto.

Aos meus pais e irmão, agradeço por serem a base de todas as minhas realizações. Com seu amor incondicional e apoio, proporcionaram-me a estrutura e o suporte necessários para trilhar meu caminho e alcançar meus objetivos.

Ao meu companheiro Ricardo, por escolher viver ao meu lado e ser parte de todas as minhas conquistas.

Às minhas amigas Mirelle e Rhiala, agradeço de coração pelo apoio incondicional, torcida e por serem verdadeiros portos seguros ao longo desses anos.

Aos Doutores Hudson V. Tomé e Wagner F. Barbosa, agradeço por toda ajuda neste projeto.

Aos membros da banca avaliadora, agradeço pelas contribuições.

RESUMO

BARBOSA, Andreza Ribas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Suscetibilidade de abelhas sem ferrão ao inseticida dimetoato.** Orientador: Gustavo Ferreira Martins. Coorientadores: Lorena Lisbetd Botina Jojoa e Renan dos Santos Araújo.

As abelhas sem ferrão (Meliponini) constituem o maior grupo de polinizadores tropicais e subtropicais do mundo e têm enfrentado um declínio associado a diversos fatores, como o uso extensivo de agroquímicos. A falta de dados sobre a suscetibilidade desses polinizadores levanta dúvidas sobre a extrapolação adequada dos resultados de toxicidade baseados na espécie exótica *Apis mellifera*, comumente utilizada nos processos de registro e uso de agroquímicos no Brasil. Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda do inseticida neurotóxico dimetoato (composto referência em testes laboratoriais de toxicidade aguda em abelhas) em abelhas sem ferrão, comparando com os resultados obtidos para *A. mellifera*. Foram investigadas diversas espécies de abelhas sem ferrão, incluindo *Melipona quadrifasciata*, *Melipona mondury*, *Melipona scutellaris*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Scaptotrigona xanthotricha*, *Tetragona clavipes*, *Partamona helleri*, *Friseomelitta varia*, *Trigona spinipes*, *Tetragonisca angustula* (forrageiras) e *Plebeia droryana* (operárias adultas). As abelhas foram expostas ao dimetoato conforme os protocolos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para exposição aguda oral e por contato. A sobrevivência foi avaliada até 96 horas e as doses letais médias (DL₅₀) em 24 horas foram estimadas para ambos os tipos de exposição em cada espécie. As DL₅₀-24h foram utilizadas para obter as curvas de distribuição da sensibilidade das espécies e determinar a dose de efeito (HD5). Também foi analisado o peso corporal como um preditor da sensibilidade interespecífica. O dimetoato afetou a taxa de sobrevivência de todas as espécies. *Melipona scutellaris* exibiu a maior DL₅₀ para a exposição oral (0,064 µg i.a./abelha), *T. spinipes* apresentou a maior DL₅₀ para a exposição por contato (0,041 µg i.a./abelha), enquanto *S. xanthotricha* e *T. angustula* apresentaram menores DL₅₀ para exposição oral (0,0087 µg i.a./abelha) e exposição por contato (0,0020 µg i.a./abelha), respectivamente. Através do cálculo do fator de extrapolação (DL₅₀-24h *A. mellifera*/10x) utilizado como referência nas estimativas de risco oral (0,0045 µg i.a./abelha) e contato (0,0041 µg i.a./abelha), foi verificado que a maioria das espécies de abelhas sem ferrão testadas nas duas formas de exposição apresentou um nível de proteção adequado, com exceção de *T. angustula* e *P. droryana* na exposição por contato. O valor de HD5, obtido através da Análise de Sensibilidade das espécies,

foi de 0,013 μg i.a./abelha para exposição oral e 0,0022 μg i.a./abelha para exposição por contato. Além disso, a suscetibilidade variou entre as espécies de acordo com o tipo de exposição (contato ou oral), e *A. mellifera* foi menos suscetível ao dimetoato do que a maioria das espécies sem ferrão. O peso corporal não se mostrou um preditor estatisticamente significativo da suscetibilidade. Esses resultados indicam que o dimetoato é potencialmente tóxico e prejudicial à sobrevivência das 12 espécies de abelhas, tanto na exposição oral quanto por contato. Esses dados são relevantes para uma inclusão adequada das diferentes espécies de abelhas sem ferrão na avaliação de risco, representando um avanço na compreensão dos efeitos dos pesticidas em Meliponini.

Palavras-chave: Abelhas nativas. Toxicidade. Meliponini. Organofosforado. Curvas de distribuição da sensibilidade das espécies.

ABSTRACT

BARBOSA, Andreza Ribas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Susceptibility of stingless bees to the insecticide dimethoate.** Advisor: Gustavo Ferreira Martins. Co-advisors: Lorena Lisbetd Botina Jojoa and Renan dos Santos Araújo.

Stingless bees (Meliponini) constitute the largest group of tropical and subtropical pollinators in the world and have been facing a decline associated with various factors, such as the extensive use of agrochemicals. The lack of data on the susceptibility of these pollinators raises questions about the proper extrapolation of toxicity results based on the exotic species *Apis mellifera*, commonly used in the registration and use of agrochemicals in Brazil. This study aimed to evaluate the acute toxicity of the neurotoxic insecticide dimethoate (a reference compound in acute toxicity laboratory tests for bees) in stingless bees, comparing it with the results obtained for *A. mellifera*. Various species of stingless bees were investigated, including *Melipona quadrifasciata*, *Melipona mondury*, *Melipona scutellaris*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Scaptotrigona xanthotricha*, *Tetragona clavipes*, *Partamona helleri*, *Frieseomelitta varia*, *Trigona spinipes*, *Tetragonisca angustula* (foragers), and *Plebeia droryana* (adult workers). The bees were exposed to dimethoate following the protocols of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) for acute oral and contact exposure. Survival was assessed for up to 96 hours, and the median lethal doses (LD₅₀) at 24 hours were estimated for both types of exposure in each species. The LD₅₀-24h values were used to obtain sensitivity distribution curves for the species and determine the effective dose (HD5). Body weight was also analyzed as a predictor of interspecific sensitivity. Dimethoate affected the survival rate of all species. *Melipona scutellaris* exhibited the highest LD₅₀ for oral exposure (0.064 µg a.i./bee), *T. spinipes* had the highest LD₅₀ for contact exposure (0.041 µg a.i./bee), while *S. xanthotricha* and *T. angustula* had the lowest LD₅₀ for oral exposure (0.0087 µg a.i./bee) and contact exposure (0.0020 µg a.i./bee), respectively. By calculating the extrapolation factor (LD₅₀-24h *A. mellifera*/10x) used as a reference in oral (0.0045 µg a.i./bee) and contact (0.0041 µg a.i./bee) risk estimates, it was determined that most of the tested stingless bee species in both forms of exposure exhibited an adequate level of protection, except for *T. angustula* and *P. droryana* in contact exposure. The HD5 value, obtained through species sensitivity analysis, was 0.013 µg a.i./bee for oral exposure and 0.0022 µg a.i./bee for contact exposure. Furthermore, susceptibility varied among species according to the type of exposure (contact or oral), and *A. mellifera* was less susceptible to dimethoate than most stingless bee species. Body

weight did not prove to be a statistically significant predictor of susceptibility. These results indicate that dimethoate is potentially toxic and detrimental to the survival of the 12 bee species, both in oral and contact exposure. These data are relevant for the proper inclusion of different stingless bee species in risk assessment, representing an advancement in the understanding of the effects of pesticides on Meliponini.

Keywords: Native bees. Toxicity. Meliponini. Organophosphate. Species sensitivity distribution curves.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
2.1. Inseticida.....	11
2.2. Abelhas.....	12
2.3. Ensaio de toxicidade.....	14
2.3.1. Exposição oral.....	14
2.3.2. Exposição por contato.....	15
2.4. Análise estatística.....	15
3. RESULTADOS.....	16
3.1. Sobrevivência.....	16
3.2. Doses letais (DL ₅₀).....	18
3.2.1. Exposição oral.....	18
3.2.2. Exposição por contato.....	19
3.3. Peso corporal x sensibilidade.....	20
3.4. Distribuição de sensibilidade (SSD).....	20
3.4.1. Exposição oral.....	20
3.4.2. Exposição por contato.....	20
4. DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS.....	27
7. MATERIAL SUPLEMENTAR.....	32

INTRODUÇÃO

Os efeitos tóxicos dos agroquímicos têm sido associados ao declínio das colônias das abelhas (IPBES, 2016; Siviter et al., 2021), as quais são expostas principalmente durante a atividade de forrageamento e coleta de alimento contaminado (Johnson, 2015). A exposição a agroquímicos está associada à alta mortalidade das abelhas, além de efeitos subletais sobre o comportamento, fisiologia, morfologia, entre outros (Bernardes et al., 2022; Siviter et al., 2021; Vanbergen, 2021). Nesse contexto, protocolos para a regulamentação, liberação e uso dos agroquímicos na agricultura tem sido proposto em diferentes países com o intuito de minimizar os riscos ecológicos em organismos não alvo, como as abelhas (Cham et al., 2017; EFSA, 2013; Pires et al., 2018).

A avaliação de risco toxicológico é abordada sob diversas perspectivas por determinadas agências e governos (Cham et al., 2017; Ippolito et al., 2020). Essa avaliação é baseada em protocolos padronizados, que se concentram nos efeitos toxicológicos em abelhas, com particular ênfase na espécie *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (OECD 1998 a,b; EFSA, 2013). Devido à sua ampla utilização como modelo biológico padrão em estudos toxicológicos, há uma quantidade substancial de pesquisas publicadas sobre essa espécie em comparação com as abelhas nativas (Bernardes et al., 2022). Dessa forma, o potencial tóxico de agroquímicos reportado para *A. mellifera* tem sido extrapolado para outras espécies de abelhas (Cham et al., 2020; EFSA, 2013). No entanto, nas últimas décadas, os estudos toxicológicos têm se esforçado para incluir diferentes grupos de abelhas das tribos Bombini e Meliponini (Bernardes et al., 2022), uma vez que essas abelhas nativas também têm sofrido com o declínio de suas colônias. Além disso, ao comparar a sensibilidade entre *A. mellifera* e espécies de abelhas nativas a diferentes agroquímicos, foi demonstrada diferenças na sobrevivência entre esses dois grupos de abelhas (Arena & Sgolastra, 2014; Tomé et al., 2017).

Para avaliação de risco de agroquímicos às espécies não-*Apis* é aplicado um fator de extrapolação de 10 sobre a dose letal mediana (DL₅₀) encontrada em avaliações com *A. mellifera*. Esse fator de extrapolação -10- baseia-se na meta-análise feita por Arena e Sgolastra (2014), que embora tenha demonstrado alta variabilidade de suscetibilidade entre espécies de abelhas, também proporciona 95% de proteção às espécies não-*Apis*. Desde então, esse fator de extrapolação tem sido adotado por agências governamentais no processo regulatório de agroquímicos, inclusive no Brasil (Cham et al., 2020; EFSA, 2013). No entanto, estudos com foco nos efeitos dos agroquímicos em outras espécies, como as abelhas sem ferrão, são escassos

(Lima et al., 2016), e a sensibilidade entre as espécies pode variar de acordo com o tipo de exposição e espectro de ação do agroquímico (Del Sarto et al., 2014). Além disso, o fator de extrapolação dos dados de ensaios com a *A. mellifera* pode não proteger as abelhas sem ferrão (De Assis et al., 2022).

Embora a importância dos diversos grupos de abelhas na agricultura e no meio ambiente seja amplamente reconhecida (IPBES, 2016), os protocolos para ensaios toxicológicos, com exceção das abelhas dos gêneros *Apis*, *Bombus* e *Osmia* (OECD, 2017a, b; EFSA et al., 2023), ainda não abrangem todos os grupos de abelhas, como é o caso das abelhas sem ferrão. Embora existam protocolos disponíveis para testes toxicológicos com essas abelhas (Botina et al., 2020; Dorigo et al., 2019; Rosa-Fontana et al., 2020), eles ainda não são reconhecidos pelas agências governamentais de países como o Brasil, o qual abriga grande diversidade de tais polinizadores (Pedro, 2014). Portanto, ainda há uma lacuna a ser preenchida em relação aos ensaios toxicológicos que utilizam diferentes espécies de abelhas nativas para revelar o verdadeiro cenário desses polinizadores diante da exposição a agroquímicos (Pedro et al., 2014; Fisher, 2021).

As abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) constituem o grupo mais diverso de insetos eussociais de regiões tropicais e subtropicais (Michener, 2013; Pedro, 2014). Essas abelhas apresentam grande diversidade morfológica, hábitos de nidificação, comportamento e ecologia, o que lhes torna polinizadores chave em ecossistemas tropicais e subtropicais (Michener, 2000; Roubik et al., 2006; Slaa et al., 2006; Roubik et al., 2014). Espécies de abelhas sem ferrão estão presentes em cultivos e associadas ao aumento do rendimento de algumas culturas agrícolas (Giannini et al., 2015). Devido à presença frequente nessas áreas, essas abelhas estão constantemente expostas a agroquímicos, tais como inseticidas, que se tornaram uma ameaça à sobrevivência desse grupo (Toledo-Hernández et al., 2022; Tosi et al., 2022).

O inseticida dimetoato pertence ao grupo químicos dos organofosforados, é amplamente utilizado na agricultura e atua como inibidor irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE), causando a morte do inseto (Thapa, 2017). O dimetoato é um inseticida representativo, reconhecido como composto de referência nos testes toxicológicos *in vitro* por agências reguladoras. Sua solubilidade em água e solventes orgânicos o torna uma escolha vantajosa para avaliações toxicológicas em laboratório. Além disso, sua alta toxicidade para as abelhas e valores de DL_{50} semelhantes em exposição oral e por contato conferem-lhe resistência na

avaliação dos impactos ambientais e em estudos comparativos de toxicidade entre diferentes substâncias (Gough et al., 1994).

Na última de década, estudos toxicológicos em abelhas sem ferrão têm proporcionado informações relevantes acerca dos efeitos letais e subletais dos agroquímicos quando abelhas adultas são expostas via oral e contato (Padilha et al., 2020; Piovesan et al., 2020; Brigante et al., 2021; Toledo et al., 2022). A resposta toxicológica de poucas espécies de abelhas sem ferrão (*Partamona helleri*, *Melipona scutellaris*, *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona postica*, *Trigona fulviventris*, *Scaptotrigona mexicana*) tem sido comparada de fato com a espécie *A. mellifera* (Del Sarto et al., 2014; Gómez-Escobar, 2014; Jacob et al., 2019; Miotelo et al., 2021; Mena et al., 2023). Isso revela uma ausência de estudos toxicológicos que adotem uma abordagem regulatória comparando a sensibilidade entre espécies de abelhas sem ferrão e *A. mellifera*, as quais são relevantes nas avaliações de risco dos agroquímicos (IPBES, 2016, Bernardes et al., 2022). Em virtude da diversidade das abelhas sem ferrão e suas características biológicas peculiares (Grüter, 2020), as avaliações toxicológicas têm sido restritas pela falta de métodos de manutenção das colônias e sob condições de laboratório (Botina et al., 2020). Além disso, a distribuição geográfica de algumas espécies de abelhas sem ferrão é restrita a certos ecossistemas e condições ambientais, como *M. scutellaris* (Nordeste), *Melipona capixaba* (Espírito Santo) e *Plebeia lucii* (Sudeste), o que impõe restrições quanto à disponibilidade de abelhas para testes (Cham et al., 2019; Menezes et al., 2023). Portanto, o conhecimento do cenário real da resposta toxicológica da interação das abelhas sem ferrão a agroquímicos é limitado e negligenciado pelas autoridades governamentais. Diante desse cenário, este estudo investigou a resposta de 11 espécies de abelhas sem ferrão em comparação com a exótica *A. mellifera*, visando identificar possíveis diferenças interespecíficas na sensibilidade ao inseticida dimetoato. Além disso, o presente estudo fornece dados para avaliar a eficácia do fator de segurança, empregado pelas autoridades brasileiras em relação às abelhas sem ferrão (Cham et al., 2020).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Inseticida

Uma formulação comercial de dimetoato, Dimexion[®], (concentrado emulsionável composto de dimetoato: 400 g/L; ciclohexanona: 308,0 g/L; xileno: 290,0 g/L; outros: 83 g/L), da FMC Química do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil, foi utilizada para os bioensaios de

toxicidade. As diferentes doses do dimetoato foram obtidas seguindo as diretrizes da *Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico* (OECD, 1998a,1998b) e oferecidas às abelhas por duas vias de exposição, oral e contato agudo. As doses oferecidas oralmente às abelhas foram preparadas a partir da diluição do inseticida em uma solução de sacarose 50% (p/v) (Êxodo Científica – Sumaré, São Paulo, Brasil) que, por sua vez, foi preparada utilizando água deionizada. Para a exposição via contato, o inseticida foi diluído primeiramente em água e as doses foram preparadas em acetona. Maiores informações no item 2.3.

2.2. Abelhas

Os ensaios de toxicidade foram conduzidos com permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO, ID 85749), utilizando forrageiras de 11 espécies de abelhas sem ferrão (Meliponini) e *Apis mellifera* (Apini). As abelhas foram coletadas em quatro locais distintos dentro da Universidade Federal de Viçosa (UFV), como descrito na Tabela 1 (Universidade Federal de Viçosa, MG, 20°45'38.8"S 42°52'12.7"W; Mata do Paraíso, Viçosa, MG, 20°48'04.9"S 42°51'58.5"W, e o Apiário Central da UFV, Viçosa, MG, 20°45'31.0"S 42°52'05.6"W). Além disso, abelhas também foram coletadas no Condomínio Sossego no município de Coimbra, MG (20°48'58.5"S 42°49'53.9"W). Abelhas de três colônias de cada espécie foram coletadas na entrada dos ninhos utilizando frascos de vidro, exceto para *M. scutellaris* e *P. droryana*, as quais foram utilizadas duas colônias e *S. bipunctata* a qual foi utilizada uma colônia. Para essas espécies, coletou-se uma quantidade maior de abelhas dos ninhos, assegurando que o tamanho amostral se aproximasse daquelas espécies com três colônias. Além disso, *T. angustula* e *P. droryana* foram coletadas a partir da abertura superior da caixa racional, e com auxílio de um saco plástico acoplado na abertura, no qual as abelhas subiram. Posteriormente, as abelhas foram transportadas ao Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da UFV e acondicionadas em Incubadoras de Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O) com temperatura controlada, em completa escuridão. A temperatura foi ajustada de acordo com as particularidades de cada espécie, encontradas na literatura (Tabela 1). Antes da exposição, abelhas da mesma colônia foram anestesiadas com dióxido de carbono (CO₂) até que estivessem imóveis e agrupadas em recipientes plásticos de 500 mL (peso corporal maior que 70 mg) ou 250 mL (peso corporal abaixo de 70 mg). Os recipientes foram previamente preparados seguindo a metodologia descrita em Botina et al. (2020). Todas as espécies de abelhas foram submetidas a diluições seriadas do inseticida e as doses foram determinadas por meio de bioensaios de mortalidade. Cada tratamento foi constituído por três réplicas, e cada

réplica constituída por 10 abelhas. Minutos após a coleta das abelhas nos ninhos, foram selecionados 20 indivíduos pertencentes a diferentes colônias para estimar a média do peso corporal em balança de precisão (AG 200, Gehaka, São Paulo, Brasil) (Tabela 1).

Tabela 1. Características gerais das 12 espécies de abelhas expostas ao dimetoato.

Espécie	Local de coleta	Temperatura de exposição (°C)	Peso corporal médio (mg)	Origem dos ninhos	Número de ninhos	Volume da solução com inseticida aplicada via contato (µL)
<i>A. mellifera</i> (Linnaeus, 1758)	Apiário da UFV	34°C ¹	74,1	Caixa racional	3	2
<i>P. helleri</i> (Friese, 1900)	Apiário da UFV	28°C ²	17,6	Galhos de árvores	3	1
<i>M. mondury</i> (Smith, 1863)	Mata do Paraíso - UFV e Apiário da UFV	28°C ³	75,1	Caixa racional	3	2
<i>F. varia</i> (Lepeletier, 1836)	Apiário da UFV	30°C ⁴	10,8	Caixa racional	3	1
<i>T. spinipes</i> (Fabricius, 1793)	Campus da UFV e Coimbra – MG	28°C ⁵	21,1	Galhos de árvores	3	1
<i>S. xanthotricha</i> (Moure, 1950)	Campus da UFV e Apiário da UFV	29°C ⁶	20,5	Caixa racional e tronco de Árvore	3	1
<i>S. bipunctata</i> (Lepeletier, 1836)	Apiário da UFV	28°C ⁷	18,4	Caixa racional	1	1
<i>T. clavipes</i> (Fabricius, 1804)	Apiário da UFV	28°C ⁸	15,3	Caixa racional e tronco de árvore	3	1
<i>M. quadrifasciata</i> (Lepeletier, 1836)	Coimbra - MG e Apiário da UFV	28°C ⁹	93,8	Caixa racional	3	2
<i>T. angustula</i> (Latreille, 1811)	Coimbra - MG e Apiário da UFV	25°C ¹⁰	3,14	Caixa racional	3	0.5
<i>P. droryana</i> (Friese, 1900)	Apiário da UFV	28°C ¹¹	4,98	Caixa racional	2	0.5

<i>M. scutellaris</i> (Latreille, 1811)	Coimbra – MG	28°C ¹²	87,24	Caixa racional	2	2
--	-----------------	--------------------	-------	-------------------	---	---

¹Jones et al., 2006; ²Botina et al., 2020; ³Lima, 2004; ⁴Da Silva et al., 2022; ⁵Franco et al., 2022; ⁶Araújo, 2005; ⁷Peruzzolo et al., 2021; ⁸Castro, 2012; ⁹Del Sarto, 2009; ¹⁰Alemida, 2020; ¹¹Sbordoni, 2015; ¹²Lourenço et al., 2012.

As abelhas ficaram em jejum por uma hora com a finalidade de estimular o consumo da dieta contaminada (Botina et al. 2020). A dieta foi fornecida durante o experimento a partir de um microtubo de centrífuga de 2 mL perfurado, encaixado em um furo (~13 mm de diâmetro) na parte inferior do recipiente plástico. A identificação das espécies foi feita considerando o fenótipo das operárias, as características estruturais dos ninhos, incluindo a entrada e organização interna dos favos (Menezes et al. 2023).

2.3. Ensaios de toxicidade

Foram utilizadas colônias de 11 e 10 espécies de abelhas sem ferrão para os testes de exposição aguda oral e contato, respectivamente. Além disso, *A. mellifera* foi incluída em ambos os tratamentos. A exposição à solução de sacarose não contaminada foi utilizada para avaliar a mortalidade natural (controle). A avaliação da mortalidade ocorreu após 24h de exposição (6h de exposição ao inseticida + 18h após a troca do alimento com inseticida e fornecimento da dieta contendo somente solução de sacarose) e monitorada diariamente até as 96h do início do experimento. Insetos totalmente imóveis foram considerados mortos.

O consumo da dieta foi calculado pesando o alimentador com a dieta contaminada antes e após a exposição em uma balança de precisão (AG 200 – Gehaka, São Paulo, Brasil). A fim de obter a quantidade de consumo médio de alimento por abelha, três recipientes plásticos com seus respectivos alimentadores com a solução de sacarose, sem abelhas, foram colocados na incubadora durante o experimento para estimar a taxa de evaporação, que posteriormente foi subtraída da taxa de consumo da dieta das abelhas para a determinação do consumo médio do alimento por abelha (Botina et al., 2020).

2.3.1. Exposição oral

Para a exposição oral, o inseticida foi diluído em solução de sacarose. De acordo com o protocolo da OECD (1998a), a DL₅₀ de referência para o dimetoato se encontra na faixa de 0,10 – 0,35 µg de ingrediente ativo (i.a.) por forrageira de *A. mellifera*. Realizou-se pré-testes para determinar cinco doses do inseticida dentro do intervalo reportado pela OECD, de forma a

compreender o intervalo de 1 a 100% de mortalidade, e estimar a DL_{50} para cada espécie de abelhas sem ferrão e *A. mellifera*. Neste caso, determinou-se que a dose máxima do inseticida, que compreende 100% de mortalidade em 24h para todas as espécies, é de 0,30 μg i.a./abelha.

Cada diluição do inseticida foi oferecida durante um período de 6h, enquanto o grupo controle recebeu apenas solução de sacarose ao longo de todo o ensaio. O consumo de alimento foi estimado no grupo tratado com o inseticida e no grupo controle pela determinação do peso do alimentador antes e após a exposição. Após 6h de exposição, o alimentador foi pesado e trocado por um alimentador com solução de sacarose (sem inseticida), disponibilizado *ad libitum* até o fim do experimento. Os valores de DL_{50} da exposição oral foram calculados a partir da quantidade do consumo médio do inseticida por abelha.

2.3.2. Exposição por contato

De acordo com o protocolo da OECD (OECD, 1998b), a DL_{50} de referência para o dimetoato está na faixa de 0,10 – 0,30 μg de i.a./abelha *A. mellifera*. Com base neste valor, uma solução estoque foi preparada com 15 mg de i.a. em 15 mL de água deionizada. A partir da solução estoque, a dose máxima de tratamento correspondeu a aplicação de 0,20 μg i.a./abelha e cinco diluições foram obtidas, as quais foram completadas com acetona até atingir o volume final de 10 mL de solução. As doses escolhidas compreenderam o intervalo de 1 a 100% de mortalidade para determinar as DL_{50} para cada espécie testada (Tabela 3). A acetona é um solvente orgânico considerado não tóxico para abelhas *A. mellifera* e foi usada como composto controle (OECD, 1998b).

A solução do inseticida foi aplicada na região dorsal do tórax com ajuda de uma micropipeta de volume máximo de 5 μL . As espécies com peso corporal inferior a 9 mg receberam 0,5 μL da solução, as espécies com peso entre 9 mg e 30 mg receberam uma dose de 1 μL , e as espécies com mais de 30 mg receberam uma dose de 2 μL (Tabela 1). O grupo controle recebeu apenas acetona. O alimento fornecido durante todo o experimento foi uma solução de sacarose 50% (p/v). A sobrevivência das abelhas foi monitorada diariamente até completar 96h de experimento.

2.4. Análise estatística

Os dados de sobrevivência foram submetidos a análise de sobrevivência utilizando a estimativa de Kaplan-Meier. A similaridade geral entre as curvas de sobrevivência foi testada utilizando o teste de χ^2 de log-rank ($P < 0,05$) (R Core Team 2023).

Os valores da mortalidade foram corrigidos utilizando a fórmula de Abbott (1925), quando necessário e, posteriormente, se realizou a análise de probit para estimar as DL_{50} com seus respectivos intervalos de confiança a 95% (IC-95%) (PROC PROBIT; SAS Institute, 2008). Para determinar se existe uma relação entre o peso corporal das abelhas e a DL_{50} de cada espécie, os valores de DL_{50} foram submetidos ao modelo aditivo generalizado com estimativa de suavidade integrada usando *splines* de regressão cúbica onde o termo de suavização foi o peso. O ajuste do modelo aditivo generalizado foi realizado usando a função *gam* do pacote *mgcv* (Wood, 2017). Os resíduos foram analisados por inspeção visual (gráfico Quantile-Quantile). A análise foi realizada no software R (R Core Team, 2023).

Para permitir a comparação da suscetibilidade entre as espécies, foi construída uma curva de Distribuição de Sensibilidade das Espécies para os dois tratamentos ajustada aos valores de DL_{50-24h} de todas as espécies de abelha sem ferrão e *A. mellifera*. Os valores de DL_{50} de todas as espécies de abelhas foram inseridos no software ETX (Effective Toxicity Exponent, ETX 2.3.) (Van Vlaardingen et al., 2013). Em seguida, estimou-se a curva SSD usando um modelo log-linear. A dose de efeito para 5% (HD5) e a dose de efeito para 50% (HD50) para as abelhas sem ferrão e *A. mellifera* abordadas na análise foi obtida pelos resultados gerados pelo software (Wheeler et al., 2002). A log-normalidade foi submetida ao teste de Anderson-Darling, no nível de significância de 5%. O pacote "*fitdistrplus*" foi empregado para ajustar a curva SSD.

3. RESULTADOS

3.1. Sobrevivência

A análise de sobrevivência, em ambas as exposições oral e por contato, revelou diferenças significativas entre os tratamentos para todas as espécies ($P < 0.001$, Tabela 2, Figuras S1-S12). As doses que compreendem o intervalo de 0 a 100% de mortalidade obtidas para *A. mellifera* (0,8050 e 0,07 μg i.a./abelha na exposição oral e 0,110 e 0,06 μg i.a./abelha por contato) estão dentro da faixa da DL_{50} reportada pela OECD para a espécie. O inseticida foi altamente tóxico para todas as espécies testadas, incluindo *A. mellifera*, atingindo 0 – 5 % de sobrevivência após 18h de exposição. Espécies como *M. mondury*, *T. angustula* e *P. droryana* exibiram alta mortalidade com as doses anteriormente mencionadas, sendo que a dose 0,03 μg i.a./abelha na exposição oral e contato para *M. mondury* diminuiu sua sobrevivência

entre 0 – 5% após 18h de exposição, respectivamente. A dose 0,02 e 0,014 µg i.a./abelha via exposição por contato para *T. angustula* e *P. droryana*, respectivamente, alcançou 0% de sobrevivência após 18h de exposição. Portanto, para essas três espécies foi necessário preparar diluições com menos ingrediente ativo para estimar a DL₅₀ e estabelecer as cinco doses para cada espécie (Tabela 3). As análises de sobrevivência de cada espécie de abelha estão no material suplementar (Figuras S1-12).

Tabela 2. Parâmetros das análises de sobrevivência dos ensaios de exposição ao dimetoato (oral e contato) em diferentes abelhas

Espécies	Exposição	χ^2	DF	P-valor
<i>A. mellifera</i>	Oral	149	5	0,001
	Contato	161	6	0,001
<i>M. quadrifasciata</i>	Oral	142	5	0,001
	Contato	176	6	0,001
<i>S. bipunctata</i>	Oral	144	6	0,001
	Contato	176	6	0,001
<i>S. xanthotricha</i>	Oral	145	5	0,001
	Contato	145	4	0,001
<i>T. clavipes</i>	Oral	98,5	5	0,001
	Contato	113	5	0,001
<i>P. helleri</i>	Oral	104	4	0,001
	Contato	156	5	0,001
<i>T. spinipes</i>	Oral	112	4	0,001
	Contato	96,9	4	0,001
<i>F. varia</i>	Oral	170	5	0,001
	Contato	153	5	0,001
<i>M. mondury</i>	Oral	169	5	0,001
	Contato	146	4	0,001
<i>T. angustula</i>	Contato	150	5	0,001
<i>P. droryana</i>	Contato	122	4	0,001
<i>M. scutellaris</i>	Oral	104	5	0,001

Tabela 3. Doses utilizadas nos ensaios de exposição oral e por contato ao dimetoato em abelhas

Espécies	Exposição	Doses ($\mu\text{g i.a./abelha}$)
<i>A. mellifera</i>	Oral	0,0139; 0,0303; 0,0392; 0,0742; 0,8050
	Contato	0,00682; 0,0275; 0,0330; 0,0550; 0,066; 0,1100
<i>M. quadrifasciata</i>	Oral	0,0180; 0,0250; 0,0700; 0,1200; 0,2330
	Contato	0,0060; 0,0130; 0,0270; 0,0550; 0,1100; 0,1650; 0,1100
<i>S. bipunctata</i>	Oral	0,0042; 0,0047; 0,0140; 0,0270; 0,0520; 0,1420
	Contato	0,0220; 0,0275; 0,0550; 0,0660; 0,0880; 0,1000
<i>S. xanthotricha</i>	Oral	0,0030; 0,0060; 0,0180; 0,0200; 0,0220
	Contato	0,0034; 0,0069; 0,0550; 0,1000
<i>T. clavipes</i>	Oral	0,0110; 0,0210; 0,0340; 0,0820; 0,0920
	Contato	0,0070; 0,0140; 0,0280; 0,0550; 0,1000
<i>P. helleri</i>	Oral	0,0020; 0,0100; 0,0340; 0,3900
	Contato	0,0011; 0,0110; 0,0165; 0,0330; 0,1100
<i>T. spinipes</i>	Oral	0,0100; 0,0200; 0,0490; 0,0840
	Contato	0,0060; 0,0100; 0,0275; 0,1000
<i>F. varia</i>	Oral	0,0068; 0,0100; 0,0460; 0,0590; 0,0690
	Contato	0,00341; 0,00693; 0,0137; 0,0275; 0,0550
<i>M. mondury</i>	Oral	0,0033; 0,0126; 0,0250; 0,0356; 0,0646
	Contato	0,0001; 0,0022; 0,0330; 0,0660
<i>T. angustula</i>	Contato	0,0004; 0,0008; 0,0017; 0,0060; 0,0280
<i>P. droryana</i>	Contato	0,0017; 0,0035; 0,0069; 0,014
<i>M. scutellaris</i>	Oral	0,0190; 0,0360; 0,0810; 0,1180; 0,1490

3.2. Doses letais (DL₅₀)

A comparação da toxicidade do inseticida entre as espécies de abelhas revelou uma variabilidade na sensibilidade ao inseticida entre as espécies. Os dados correspondentes às espécies avaliadas, incluindo DL₅₀ (dose letal média), valor do teste χ^2 , graus de liberdade e valor de P-valor, estão apresentados na Tabela 4. O modelo *probit* utilizado para os resultados dos bioensaios de dose-mortalidade de todas as espécies de abelhas foram escolhidos com base no baixo valor de χ^2 e nos altos P-valor (> 0,05) obtidos nos testes de ajuste.

3.2.1. Exposição oral

A toxicidade ao dimetoato diferiu entre as espécies, sendo *S. xanthotricha* a espécie mais sensível e *M. scutellaris* a menos sensível à ingestão do inseticida. Devido ao baixo consumo de alimento, não foi possível calcular a dose consumida por *P. droryana* e *T.*

angustula. No teste oral agudo, não foi possível identificar uma faixa de doses que abrangesse a curva de mortalidade para essas duas espécies. O fator de extrapolação baseado na DL₅₀-24h de *A. mellifera* foi 0,0045 µg i.a./abelha.

3.2.2. Exposição por contato

O valor da DL₅₀ que revelou maior toxicidade por contato foi para *T. angustula*, em contraste, as menores DL₅₀ encontradas para as espécies testadas foram em ordem decrescente para *T. spinipes*, *M. quadrifasciata*, *A. mellifera* e *S. bipunctata*. O fator de extrapolação baseado na DL₅₀-24h de *A. mellifera* foi de 0,0041 µg i.a./abelha.

Para os valores de DL₅₀ de *P. droryana* não foi possível estabelecer um intervalo de confiança porque o número de doses testadas não abrange a faixa de 0-100% de mortalidade para a construção da curva de dose-resposta.

Tabela 4. Toxicidade aguda (DL₅₀-24h) de dimetoato via exposição oral e por contato em abelhas

Espécies	Tratamento	DL ₅₀ ug/abelha	χ ²	DF	p-valor
<i>A. mellifera</i>	Oral	0,04450 (0,04081 - 0,05296)	0,349	3	0,9506
	Contato	0,04054 (0,03725 - 0,04417)	2,7295	4	0,6041
<i>M. quadrifasciata</i>	Oral	0,03421 (0,02939 - 0,04081)	1,6648	3	0,6448
	Contato	0,04095 (0,03435 - 0,04848)	2,8816	4	0,5778
<i>S. bipunctata</i>	Oral	0,03621 (0,02203 - 0,06969)	8,8761	4	0,0643
	Contato	0,03996 (0,03015 - 0,05027)	8,4073	4	0,0777
<i>S. xanthotricha</i>	Oral	0,00877 (0,00721 - 0,01035)	1,5676	3	0,6668
	Contato	0,01945 (0,01366 - 0,02758)	0,0866	2	0,9576
<i>T. clavipes</i>	Oral	0,02717 (0,02189 - 0,03222)	3,0477	3	0,3843
	Contato	0,01165 (0,00890 - 0,01439)	5,938	3	0,1147
<i>P. helleri</i>	Oral	0,03853 (0,02696 - 0,06239)	2,432	2	0,2964
	Contato	0,01273 (0,01150 - 0,01392)	0,0007	3	1,000
<i>F. varia</i>	Oral	0,04223 (0,03351 - 0,04586)	0,1421	3	0,9863
	Contato	0,01961 (0,01633 - 0,02380)	4,5807	3	0,2052
<i>T. spinipes</i>	Oral	0,03765 (0,00884 - 2,35164)	5,3064	2	0,0704
	Contato	0,04100 (0,03188 - 0,05580)	3,2571	2	0,1962
<i>M. mondury</i>	Oral	0,02601 (0,02279 - 0,02912)	3,5538	3	0,3139
	Contato	0,00729 (0,00450 - 0,01119)	0,2995	2	0,8609
<i>T. angustula</i>	Contato	0,00200 (0,00153 - 0,00268)	5,3119	3	0,1503

<i>P. droryana</i>	Contato	0,00234	5,7	2	0,06
<i>M. scutellaris</i>	Oral	0,06432 (0,05322 - 0,0745)	1,33	3	0,722

3.3. Peso corporal x sensibilidade

O modelo aditivo generalizado não foi significativo via exposição oral (edf = 1, F = 1,31, P = 0,286) e via contato (edf = 2,19, F = 1,99, P = 0,243), mostrando que não há dependência da DL₅₀ com o peso corporal das abelhas. Detalhe sobre os dados estão no material suplementar (Figuras suplementares S14-15).

3.4. Distribuição de sensibilidade (SSD)

3.4.1. Exposição oral

De acordo com os resultados obtidos no teste agudo oral, por meio da construção da curva SSD, a espécie mais sensível foi *S. xanthotricha*, seguida de *M. mondury*. A espécie menos sensível foi *M. scutellaris*, seguida de *A. mellifera* (Figura 1). O valor da HD5 foi de 0,013 µg i.a./abelha e da HD50 foi de 0,033 µg i.a./abelha. O valor da HD5, quer dizer que, até a dose de 0,013 µg i.a./abelha, 95% das espécies de abelhas sem ferrão testadas, incluindo *A. mellifera*, terão reduções na sua sobrevivência inferiores a 50%. Estima-se que aproximadamente 5% das espécies de abelhas possam enfrentar uma redução na taxa de sobrevivência de mais de 50%. Entre as espécies, *S. xanthotricha* foi a única que apresentou a DL₅₀ (0,0087 µg i.a./abelha) abaixo do HD5, indicando uma maior sensibilidade ao dimetoato (Figura 1).

3.4.2. Exposição por contato

De acordo com os resultados obtidos na exposição aguda por contato, utilizando a curva SSD, a HD5 (dose de referência para proteção) foi de 0,0022 µg i.a./abelha, enquanto a HD50 (dose média de efeito) foi de 0,014 µg i.a./abelha. O dimetoato demonstrou ser mais tóxico a *T. angustula* com resultados de sobrevivência abaixo da HD5 (Figura 2). Isso indica que essa espécie é mais sensível a doses mais baixas do inseticida.

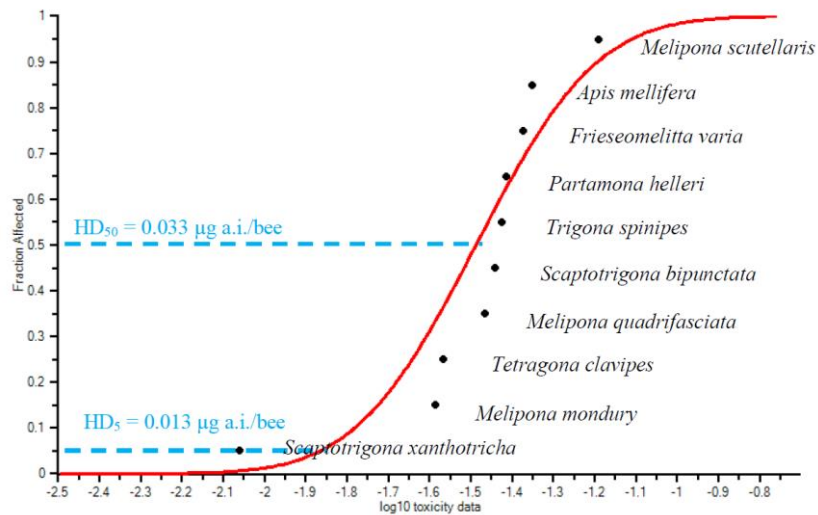


Figura 1. Curva de Distribuição da Sensibilidade das Espécies (SSD) estimada para 10 espécies de abelhas baseada nos valores de DL₅₀ (µg i.a./abelha) para exposição via oral ao dimetoato. As linhas pontilhadas representam a dose estimada para HD₅ e HD₅₀.

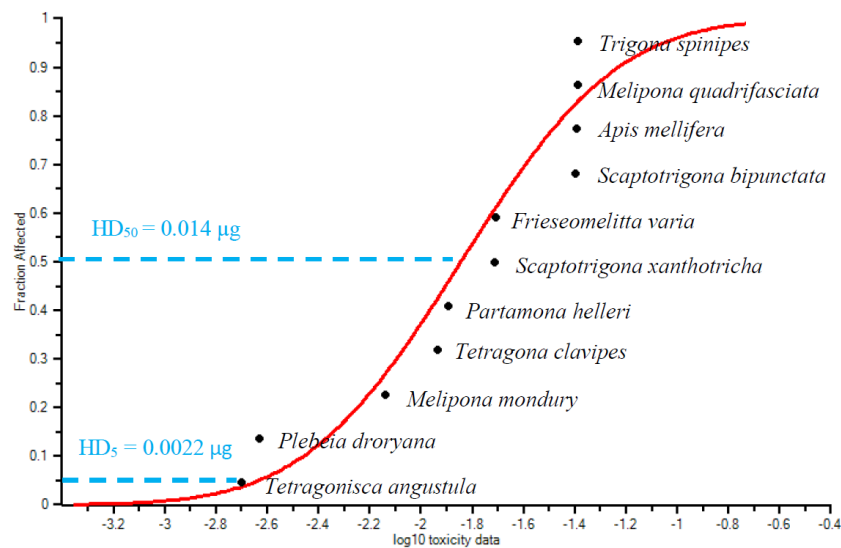


Figura 2. Curva de Distribuição da Sensibilidade das Espécies (SSD) estimada para 11 espécies de abelhas sem ferrão e *Apis mellifera* baseada nos valores de DL₅₀ (µg i.a./abelha) para via exposição por contato com o dimetoato. As linhas pontilhadas representam a dose estimada para HD₅ e HD₅₀.

4. DISCUSSÃO

Para a conservação das abelhas nativas, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) reforçou a necessidade de estudos com essas abelhas e sua interação com agroquímicos (Pires, et al., 2018). De acordo com o fator de extrapolação adotado pelo IBAMA, a regulamentação, liberação e estabelecimento do uso correto de agroquímicos, são baseados na resposta tóxica de *A. mellifera* e não em estudos feitos em abelhas sem ferrão (Pires et al., 2018; Boyle et al., 2018). Este tem sido um fator preocupante devido ao fato de que a resposta toxicológica das abelhas sem ferrão é diferente da abelha africanizada *A. mellifera* (Boyle et al., 2018; Cham et al., 2018; Lima et al., 2016). Abelhas sem ferrão têm exibido alta taxa de mortalidade quando comparada à *A. mellifera* (Jacob et al., 2019; Miotelo et al., 2021; Tomé et al., 2017). No entanto, estudos que comparam a sensibilidade de várias espécies de abelhas sem ferrão em relação a *A. mellifera* ao mesmo tempo têm sido feitos de forma limitada, a partir de ensaios considerando poucas espécies de abelhas sem ferrão (Rosa-Fontana et al., 2020; De Assis et al., 2022; Lourencetti et al., 2023). Assim, os resultados do presente trabalho, utilizando protocolos da OECD adaptados a testes com 12 espécies de abelhas sem ferrão e *A. mellifera*, é o mais representativo em termos de avaliação de toxicidade do dimetoato sob duas vias de exposição (oral e contato).

A exposição ao dimetoato afetou a sobrevivência de todas as espécies testadas, o que era esperado visto que se trata de um inseticida de amplo espectro pertencente ao grupo dos organofosforados (Van Scoy et al., 2016) e sua alta toxicidade já tem sido demonstrada via exposição oral e por contato em adultos e larvas de abelhas (Dorigo et al., 2019b; Gough et al., 2015; Jacob et al., 2019; Medrzycki et al., 2013). Avaliações toxicológicas em abelhas sem ferrão apontam maior sensibilidade e menor taxa de sobrevivência após exposição a pesticidas em relação a *A. mellifera* (Arena & Sgolastra et al., 2014; Tomé et al., 2017; Sales et al., 2022; De Assis et al., 2022). No entanto, no presente estudo, as espécies *M. scutellaris* (via de exposição oral), *M. quadrifasciata*, *S. bipunctata* e *T. spinipes* responderam a exposição ao dimetoato de forma similar a *A. mellifera* nas exposições via oral e contato.

Outro importante fator é que resposta de uma espécie de abelha sem ferrão ao dimetoato pode variar em relação a *A. mellifera* de acordo com a via de exposição ao inseticida. A espécie *P. helleri* é mais sensível ao dimetoato quando exposta via contato ao inseticida. Essa variação na toxicidade de um inseticida a depender da via de exposição também foi encontrada em *M. quadrifasciata* exposta ao inseticida piretróide deltametrina, o qual foi mais tóxico a abelha sem

ferrão exposta oralmente (0,082 µg i.a./abelha), porém menos tóxico a abelha via exposição por contato (129,2 µg i.a./abelha). Portanto, é importante considerar diferentes vias de exposição nas avaliações toxicológicas com abelhas sem ferrão (Cham et al.,2019).

Nossos resultados apontaram que forrageiras de *M. scutellaris* apresentam menor sensibilidade ao dimetoato, onde a DL₅₀-24h (0,064 µg i.a./abelha) é a maior comparada com os dados das outras espécies expostas via oral. Resultados similares foram encontrados na abelha nativa *Osmia lignaria* exposta ao dimetoato, o qual a DL₅₀-24h (0,27 e 1,96 µg i.a./abelha) é maior em comparação a DL₅₀-24h (0,15 e 0,19 µg a.i/abelha) calculada para *A. mellifera* via exposição oral e contato, respectivamente. Entretanto, *M. scutellaris* demonstrou ser mais sensível que *A. mellifera* quando exposta oralmente ao fipronil (CL₅₀-48h = 0,011 e 1,27 ng i.a./µL, respectivamente) (Lourenço et al., 2012). Inclusive, *M. scutellaris* é mais sensível ao neonicotinoide tiametoxam sob exposição oral (CL₅₀ = 0,215 ng i.a./µL) em relação à *T. angustula* (CL₅₀ = 0,329 ng i.a./µL) e *S. postica* (CL₅₀ = 0,624 ng i.a./µL) (Lourencetti et al., 2023). Isso sugere que dependendo da via de exposição e do tipo agroquímico, os valores de DL₅₀ podem ser maiores ou menores entre abelhas nativas e *A. mellifera*, ressaltando a importância da inclusão de espécies de abelhas sem ferrão nesse tipo de avaliação. Por outro lado, a DL₅₀-24h (0,045 µg i.a./abelha) encontrada para *A. mellifera* foi menor que a esperada, uma vez que os intervalos da DL₅₀-24h de referência dessa espécie via exposição oral ao dimetoato é de 0,10 – 0,35 µg ia/abelha (OECD, 1998a).

Na exposição por contato, a DL₅₀ encontrada para *T. spinipes* e *A. mellifera* expostas ao dimetoato é a mesma (0,41 µg i.a./abelha). Isso foi similar a DL₅₀ encontrada para as duas espécies quando expostas por contato a dois inseticidas, dimetoato e malation, considerando uma DL₅₀ de 0,2 e 0,41 µg i.a./abelha, respectivamente (Ranz, 2020). Essa similaridade de respostas indica que a *A. mellifera* pode ser um modelo adequado para extrapolar possíveis efeitos toxicológicos na sobrevivência de *T. spinipes* sob exposição por contato a inseticidas organofosforados.

O fator de extrapolação de 10 vezes (sobre a DL₅₀ calculada para *A. mellifera*), adotado pelo IBAMA (Cham et al., 2020), cobre a faixa de sensibilidade aguda para a maioria das espécies nas duas vias de exposição, exceto para *T. angustula* e *P. droryana* por contato. Em testes com abelhas nativas europeias dos gêneros *Osmia*, *Colletes*, *Bombus*, *Andrena*, *Lisioglossum* e *A. mellifera*, via exposição oral e contato ao dimetoato, o fator de extrapolação também se mostrou seguro (Uhl et al., 2016). Esses resultados sugerem que empregar esse fator

de extrapolação de avaliações feitas com *A. mellifera*, extrapolando para abelhas nativas, pode ser seguro para o dimetoato. No entanto, estudos com abelhas sem ferrão expostas ao grupo dos neonicotinóides demonstraram que o fator de extrapolação não foi suficiente, já que esse grupo de abelhas exibe sensibilidade maior que 10x em relação a *A. mellifera* (Arena & Sgolastra, 2014; De Assis et al., 2022). Nesse sentido, não é adequado extrapolar os achados para *A. mellifera* para abelhas nativas para todos os agroquímicos, já que a sensibilidade varia entre as diferentes espécies e de acordo com o espectro de ação do agroquímico (Arena & Sgolastra, 2014).

T. angustula e *P. droryana* não foram protegidas pelo fator de extrapolação e valor do HD5 (0.0022 µg i.a./abelha) na exposição por contato, em relação a *A. mellifera*. A quantidade de i.a. de dimetoato é 20x e 17.8x menor, em relação a *A. mellifera*, para matar 50% das abelhas tratadas, respectivamente. Os inseticidas organofosforados também são mais tóxicos a *T. angustula* via contato, como ao i.a. clorpirifós com 0% de sobrevivência em comparação ao inseticida do grupo benzoilacetonitrila ciflumetofem (88% e sobrevivência) e ao fungicida do grupo triazol difenoconazol (100% de sobrevivência) (Leite et al., 2022). Da mesma maneira, forrageiras de *T. angustula* exibiram maior sensibilidade mediante exposição oral aos inseticidas malation, imidacloprid e pirazol (Fipronil) (Mena et al., 2023). Considerando a importância ecológica dessa espécie, sua associação com culturas agrícolas e sua inclusão na lista de espécies prioritárias do IBAMA, os testes toxicológicos com a *T. angustula* são imprescindíveis para avaliação de risco de agroquímicos (Pires et al., 2018).

Testes toxicológicos com forrageiras adultas de *P. droryana* são ausentes, portanto, há poucas informações sobre os efeitos dos agroquímicos sobre essa espécie. As únicas informações encontradas demonstram que rainhas de *P. droryana* criadas *in vitro* apresentaram alta mortalidade larval após exposição oral a clorpirifós, atingindo 66% de mortalidade antes de emergir. Além disso, dentre as larvas sobreviventes, 27% se tornaram operárias e não rainhas (Dos Santos et al., 2016). Essa espécie não foi incluída na lista de abelhas nativas que devem ser avaliadas quanto ao risco da exposição à agroquímicos (Pires et al., 2018), mesmo sendo relevante para a meliponicultura (Menezes et al., 2023). Além disso, os testes toxicológicos com *P. droryana* e *T. angustula* têm limitações com relação à coleta, devido a seu tamanho e comportamento de não entrar no frasco de vidro posicionado na entrada do ninho (Cham et al., 2019).

Dentre as características consideradas para determinar a sensibilidade interespecífica em abelhas, o peso corporal tem sido empregado como um preditor, onde as abelhas menores são geralmente mais sensíveis a agroquímicos que abelhas maiores. (Uhl et al., 2016; Pamminger et al., 2021; Tai et al., 2022). No entanto, no presente estudo, o peso não foi um preditor da sensibilidade entre as espécies expostas ao dimetoato. *Trigona spinipes* (peso corporal = 21,1 mg) possui mesma sensibilidade ao dimetoato que *A. mellifera* (peso corporal = 74,1 mg). Por outro lado, *M. mondury* (peso corporal = 75,1 mg) foi mais sensível ao dimetoato que a maioria das espécies testadas em ambas as exposições, mesmo que seu peso seja menor apenas que o de *M. quadrifasciata* (93,8 mg) e *M. scutellaris* (87,24 mg). O metabolismo é inversamente proporcional ao tamanho corporal, podendo ser fator determinante para uma desintoxicação rápida em abelhas menores (Ward et al., 2022). Assim, compreender os mecanismos envolvidos na resposta e defesa das abelhas sem ferrão a agroquímicos é crucial para determinar meios de proteger essas espécies.

A análise SSD também pode ser utilizada em avaliações de semi-campo e estudos de campo complexos e de alto custo (Maltby et al., 2005). A HD5 encontrada para a exposição por contato (0.0022 µg i.a./abelha) é menor que a doses derivadas do fator de extrapolação, que é adotado pelo IBAMA para exposição por contato (0.0041 µg i.a./abelha). Em contraste, a HD5 para exposição oral (0.013 µg i.a./abelha) é maior que o fator de extrapolação oral (0.0045 µg i.a./abelha). As doses de perigo encontradas na análise sugerem que o fator de extrapolação para a exposição oral oferece proteção à maioria das abelhas sem ferrão, mas via exposição por contato pode significar um risco para algumas espécies de abelhas.

No caso de *S. xanthotricha* exposta via oral ao dimetoato, a DL_{50-24h} (0.0087 µg i.a./abelha) não se enquadrou no valor de HD5. No entanto, na exposição por contato, a espécie ficou protegida, sendo a DL₅₀ maior que outras cinco espécies testadas (*F. varia*, *S. bipunctata*, *A. mellifera*, *M. quadrifasciata* e *T. spinipes*). A variação da sensibilidade de acordo com o tipo de exposição foi observada em *S. xanthotricha* exposta a outros inseticidas (Quiroga-Murcia et al., 2017). Na exposição oral ao inseticida tiametoxam, a espécie foi mais sensível em comparação com a *T. angustula*, porém, na exposição por contato *S. xanthotricha* foi mais tolerante (Quiroga-Murcia et al., 2017).

O presente trabalho apresenta informações relevantes sobre os efeitos tóxicos do dimetoato em abelhas sem ferrão em relação a *A. mellifera*. É o primeiro estudo a abordar o impacto de um inseticida em uma ampla variedade de espécies e nove gêneros evolutivamente

distantes, utilizando os protocolos da OECD. As diretrizes da OECD são amplamente adotadas internacionalmente por governos, indústria e laboratórios, padronizando os testes toxicológicos de agroquímicos e garantindo resultados adequados nos processos requeridos pelas agências governamentais (Gourmelon et al., 2016). Das 11 espécies de abelhas sem ferrão testadas, oito 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*, *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata* foram incluídas como espécies prioritárias para análise de risco no Brasil. Vale destacar que *T. spinipes* é a primeira da lista devido a sua ampla presença em diversos cultivos agrícolas. Além disso, apesar de *M. mondury* não ter sido considerada pelas autoridades brasileiras na seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de riscos a agroquímicos (Pires et al., 2018), nossos resultados indicam que ela foi uma das mais sensíveis ao dimetoato sob as duas vias de exposição, mostrando um padrão de toxicidade distinto das outras espécies do gênero *Melipona* testadas neste estudo.

5. CONCLUSÕES

Diferenças interespecíficas na resposta toxicológica das abelhas sem ferrão foram evidenciadas e comparadas com *A. mellifera*. O dimetoato reduziu a sobrevivência de todas as espécies testadas e a maioria das abelhas sem ferrão foram mais sensíveis ao inseticida, reforçando a necessidade de investigações adicionais com espécies do grupo Meliponini. Além disso, o fator de extrapolação -10- da DL_{50} regulamentado para *A. mellifera* foi seguro para a maioria das espécies, exceto para *T. angustula* e *P. droryana* via contato. Essas foram as abelhas com menor peso corporal testado e, embora a relação entre esse parâmetro e toxicidade tenha sido abordada nesse estudo, os resultados não mostraram uma relação significativa entre os dois. Além disso, observou-se uma suscetibilidade diferenciada para *S. xanthotricha* via exposição oral e *T. angustula* e *P. droryana* via contato de acordo com o valor de $HD5$, portanto, essas espécies não estão protegidas quando são expostas a $0.013 \mu\text{g i.a./bee}$ via oral e $0.0022 \mu\text{g i.a./bee}$ via contato. Assim, concluímos que é necessário considerar a diversidade de abelhas nativas e protocolos padronizados adequados para ensaios toxicológicos com o grupo, com finalidade de melhorar a comparação dos dados obtidos em diferentes estudos. Os nossos resultados fornecem importantes achados para estudos futuros sobre o potencial tóxico de agroquímicos em abelhas sem ferrão, além de ter implicações importantes para a conservação das abelhas nativas para a adoção de práticas agrícolas mais seguras e sustentáveis.

6. REFERÊNCIAS

- Almeida, F. C. R. (2020). *Efeito do fungo entomopatogênico Beauveria bassiana no reconhecimento de companheiras de ninho da abelha nativa Tetragonisca angustula (Apidae: Meliponini)* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Araújo, V. A., Serrão, J. E., Itabaiana, Y. A., Dias, L. G., & Lino Neto, J. (2020). Structural changes in the male reproductive tract of the stingless bee *Scaptotrigona xanthotricha* Moure, 1950 (Meliponini, Apidae) during sexual maturation. *Sociobiology* 67(4): 526-534.
- Arena, M., & Sgolastra, F. (2014). A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology*, 23, 324-334.
- Bernardes, R. C., Botina, L. L., Araujo, R. D. S., Guedes, R. N. C., Martins, G. F., & Lima, M. A. P. (2022). Artificial intelligence-aided meta-analysis of toxicological assessment of agrochemicals in bees. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10.
- Botina, L. L., Bernardes, R. C., Barbosa, W. F., Lima, M. A. P., Guedes, R. N. C., & Martins, G. F. (2020). Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). *MethodsX*, 7, 100906.
- Boyle, N. K., Pitts-Singer, T. L., Abbott, J., Alix, A., Cox-Foster, D. L., Hinarejos, S., ... & Steeger, T. (2019). Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. *Environmental entomology*, 48(1), 4-11.
- Brigante, J., Costa, J. O., Espíndola, E. L., & Daam, M. A. (2021). Acute toxicity of the insecticide abamectin and the fungicide difenoconazole (individually and in mixture) to the tropical stingless bee *Melipona scutellaris*. *Ecotoxicology*, 30(9), 1872-1879.
- Castro, I. D. (2012). *Obtenção artificial de rainhas e estabelecimento de novas colônias de Tetragona clavipes (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Cham, K. D. O., Rebelo, R. M., Oliveira, R. P., Ferro, A. A., Viana-Silva, F. D. C., Borges, L. D. O., ... & Macedo, T. C. (2017). Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. *Brasília: Ibama/Diqua*, 105.
- Cham, K. O., Nocelli, R. C., Borges, L. O., Viana-Silva, F. E. C., Tonelli, C. A. M., Malaspina, O., ... & Rocha, M. C. L. (2019). Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. *Environmental Entomology*, 48(1), 36-48.
- Cham, K. O.; Rebelo, R. M.; Oliveira, R. P.; Ferro, A. A.; Viana-silva, F. E. C.; Borges, L. O.; Saretto, C. O. S. D.; Tonelli, C. A. M.; Macedo, T.C. (2020). Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas. *Brasília: Ibama/Diqua*, 114.
- da Silva, J. A., Barchuk, A. R., & Wolowski, M. (2022). Protocol for the in vitro rearing of *Frieseomelitta varia* workers (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Zoologia (Curitiba)*, 39.
- de Assis, J. C., Tadei, R., Menezes-Oliveira, V. B., & Silva-Zacarin, E. C. (2022). Are native bees in Brazil at risk from the exposure to the neonicotinoid imidacloprid? *Environmental Research*, 212, 113127.
- Del Sarto, M. C. L. (2009). Toxicidade de inseticidas para as abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae).

- Del Sarto, M. C. L., Oliveira, E. E., Guedes, R. N. C., & Campos, L. A. O. (2014). Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*, *45*, 626-636.
- Dorigo, A. S., Rosa-Fontana, A. D. S., Soares-Lima, H. M., Galaschi-Teixeira, J. S., Nocelli, R. C. F., & Malaspina, O. (2019). In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. *PLoS One*, *14*(3), e0213109.
- Dos Santos, C. F., Acosta, A. L., Dorneles, A. L., Dos Santos, P. D., & Blochtein, B. (2016). Queens become workers: pesticides alter caste differentiation in bees. *Scientific Reports*, *6*(1), 31605.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. *EFSA Journal*, *11*(5), 3158.
- European Food Safety Authority (EFSA), Adriaanse, P., Arce, A., Focks, A., Ingels, B., Jölli, D., ... & Auteri, D. (2023). Revised guidance on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA Journal*, *21*(5), e07989.
- Fisher, A. (2021). Protect pollinators-reform pesticide regulations. *Nature*, *595*(7866), 172.
- Franco, T. C., Pereira, R. C., Júnior, J. O. L. V., Barcelos, J. V. P. L., França, T. A., Peçanha, L. S., ... & Silva, G. A. (2022). Mortalidade da abelha *Trigona spinipes* após ingestão de alimento contaminado com o inseticida espinosade. *Confict*, *14*(1).
- Giannini, T. C., Boff, S., Cordeiro, G. D., Cartolano, E. A., Veiga, A. K., Imperatriz-Fonseca, V. L., & Saraiva, A. M. (2015). Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. *Apidologie*, *46*, 209-223.
- Gómez-Escobar, E., Liedo, P., Montoya, P., Vandame, R., & Sánchez, D. (2014). Behavioral response of two species of stingless bees and the honey bee (Hymenoptera: Apidae) to GF-120. *Journal of Economic Entomology*, *107*(4), 1447-1449.
- Gough, H. J., McIndoe, E. C., & Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 1981–1992. *Journal of Apicultural Research*, *33*(2), 119-125.
- Gourmelon, A., & Delrue, N. (2016). Validation in support of internationally harmonised OECD test guidelines for assessing the safety of chemicals. *Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing*, 9-32.
- Grüter, C. (2020). Stingless bees. *Cham, Switzerland: Springer International Publishing*, *109*(4), 1182-1186.
- IPBES (2016). The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production.
- Ippolito, A., Aguila, M. D., Aiassa, E., Guajardo, I. M., Neri, F. M., ... & Szentes, C. (2020). *Review of the evidence on bee background mortality* (Vol. 17, No. 7, p. 1880E).
- 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.
- Johnson, R. M. (2015). Honey bee toxicology. *Annual Review of Entomology*, *60*, 415-434.

- Jones, J. C., & Oldroyd, B. P. (2006). Nest thermoregulation in social insects. *Advances in Insect Physiology*, 33, 153-191.
- Leite, D. T., Sampaio, R. B., Chambó, E. D., Aguiar, C. M. L., de Godoy, M. S., & de Carvalho, C. A. L. (2022). Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(1), 435-443.
- Lima, M. A. P. (2004). Aspectos da biologia de *Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836 e de *Melipona mondury* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae, Meliponina).
- Lima, M. A. P., Martins, G. F., Oliveira, E. E., & Guedes, R. N. C. (2016). Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. *Journal of Comparative Physiology A*, 202, 733-747.
- Lourencetti, A. P. S., Azevedo, P., Miotelo, L., Malaspina, O., & Nocelli, R. C. F. (2023). Surrogate species in pesticide risk assessments: Toxicological data of three stingless bees species. *Environmental Pollution*, 318, 120842.
- Lourenço, C. T., Carvalho, S. M., Malaspina, O., & Nocelli, R. C. F. (2012). Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89, 921-924.
- Maltby, L., Blake, N., Brock, T. C., & Van den Brink, P. J. (2005). Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 24(2), 379-388.
- Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L. P., Chauzat, M. P., Classen, C., ... & Vidau, C. (2013). Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-60.
- Mena, F., Berrocal, S., Solano, K., Herrera, E., Gallardo, M., Jiménez, K., ... & Pinnock-Branford, M. (2023). Comparison of the sensitivity of *Tetragonisca angustula* (Apidae-Meliponini) and *Apis mellifera* (Apidae-Apini) to three insecticides (malathion, imidacloprid, and fipronil) used in Costa Rica. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(5), 1022-1031.
- Menezes, C., Alves, D. D. A., Lucena, D. A., & Almeida, E. A. B. (2023). Abelhas sem ferrão relevantes para a meliponicultura no Brasil.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). JHU press.
- Miotelo, L., Dos Reis, A. L. M., Malaquias, J. B., Malaspina, O., & Roat, T. C. (2021). *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. *Environmental Pollution*, 268, 115770.
- OECD (2017a). Guideline for the testing of chemicals 246. Bumblebee, acute contact toxicity test.
- OECD (2017b). Guideline for the testing of chemicals 247. Bumblebee, acute oral toxicity test.
- 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*.

- Padilha, A. C., Piovesan, B., Morais, M. C., de B. Pazini, J., Zotti, M. J., Botton, M., & Grützmacher, A. D. (2020). Toxicity of insecticides on Neotropical stingless bees *Plebeia emerina* (Friese) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Ecotoxicology*, *29*, 119-128.
- Pamminger, T. (2021). Extrapolating acute contact bee sensitivity to insecticides based on body weight using a phylogenetically informed interspecies scaling framework. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *40*(7), 2042-2050.
- Pedro, S. R. (2014). The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology*, *61*(4), 348-354.
- Peruzzolo, M. C., Grange, L., & Ronqui, L. (2021). Mortalidade de abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* sob os efeitos dos herbicidas paraquat e diquat. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, *24*(1cont).
- Piovesan, B., Padilha, A. C., Morais, M. C., Botton, M., Grützmacher, A. D., & Zotti, M. J. (2020). Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees *Melipona quadrfasciata* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Science and Pollution Research*, *27*, 42472-42480.
- Pires, C. S. S., Torezani, K. D. S., Cham, K. O., Viana-Silva, F. E. C., Borges, L. O., Tonelli, C. A. M., ... & Cione, A. P. (2018). Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos. *Brasília: Ibama*.
- Quiroga-Murcia, D. E., Zotti, M. J., de Polanía, I. Z., & Pech-Pech, E. E. (2017). Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). *Agronomía Colombiana*, *35*(3), 340-349.
- R Core Team, A., & R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical
- Ranz, R. E. R. (Ed.). (2022). *Insecticides: Impact and Benefits of Its Use for Humanity*. BoD—Books on Demand.
- Rosa-Fontana, A., Dorigo, A. S., Galaschi-Teixeira, J. S., Nocelli, R. C., & Malaspina, O. (2020). What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. *Environmental Pollution*, *265*, 114849.
- Roubik, D. W. (2006). Stingless bee nesting biology. *Apidologie*, *37*(2), 124-143.
- Sales, V. R., Azevedo, P., Zucchi, M. I., & Nocelli, R. C. F. (2022). A systematic review of research conducted by pioneer groups in ecotoxicological studies with bees in Brazil: advances and perspectives. *Environmental Science and Pollution Research*, *29*(42), 62711-62732.
- Sbordoni, Y. S. R. (2015). *Termorregulação em abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): produção ativa de calor e metabolismo energético* (Doctoral dissertation, PhD thesis, Universidade de São Paulo).
- Simon N., Wood. (2017). *Generalized additive models: an introduction with R*. Chapman & Hall/CRC.
- Siviter, H., Bailes, E. J., Martin, C. D., Oliver, T. R., Koricheva, J., Leadbeater, E., & Brown, M. J. (2021). Agrochemicals interact synergistically to increase bee mortality. *Nature*, *596*(7872), 389-392.

- Slaa, E. J., Chaves, L. A. S., Malagodi-Braga, K. S., & Hofstede, F. E. (2006). Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. *Apidologie*, *37*(2), 293-315.
- Tai, F. K., Pattemore, D. E., Jochym, M., Beggs, J. R., Northcott, G. L., & Mortensen, A. N. (2022). Honey bee toxicological responses do not accurately predict environmental risk of imidacloprid to a solitary ground-nesting bee species. *Science of The Total Environment*, *839*, 156398.
- Thapa, S., Lv, M., & Xu, H. (2017). Acetylcholinesterase: a primary target for drugs and insecticides. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *17*(17), 1665-1676.
- Toledo-Hernández, E., Peña-Chora, G., Hernandez-Velazquez, V. M., Lormendez, C. C., Toribio-Jiménez, J., Romero-Ramírez, Y., & León-Rodríguez, R. (2022). The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. *Apidologie*, *53*(1), 8.
- Tomé, H. V., Ramos, G. S., Araújo, M. F., Santana, W. C., Santos, G. R., Guedes, R. N. C., ... & Oliveira, E. E. (2017). Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. *Royal Society Open Science*, *4*(1), 160866.
- Tosi, S., Sfeir, C., Carnesecchi, E., & Chauzat, M. P. (2022). Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta-analysis and new risk assessment tools. *Science of The Total Environment*, *844*, 156857.
- Uhl, P., Franke, L. A., Re, C., Wollmann, C., Peter, S., Jeker, L., & Brühl, C. A. (2016). Interspecific sensitivity of bees towards dimethoate and implications for environmental risk assessment. *Scientific Reports*, *6* (34439), 1–7.
- Van Scoy, A., Pennell, A., & Zhang, X. (2016). Environmental fate and toxicology of dimethoate. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237*, 53-70.
- Van Vlaardingen, P., Traas, T., Wintersen, A., & Aldenberg, T. (2004). A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data. *National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands*.
- Vanbergen, A. J. (2021). A cocktail of pressures imperils bees. *Nature*, *596*, 351-352.
- Vit, P., Pedro, S. R., & Roubik, D. (Eds.). (2013). *Pot-honey: a legacy of stingless bees*. Springer Science & Business Media.
- Ward, L. T., Hladik, M. L., Guzman, A., Winsemius, S., Bautista, A., Kremen, C., & Mills, N. J. (2022). Pesticide exposure of wild bees and honey bees foraging from field border flowers in intensively managed agriculture areas. *Science of the Total Environment*, *831*, 154697.
- Wheeler, J. R., Grist, E. P. M., Leung, K. M. Y., Morritt, D., & Crane, M. (2002). Species sensitivity distributions: data and model choice. *Marine Pollution Bulletin*, *45*(1-12), 192-202.

7. MATERIAL SUPLEMENTAR

ANDREZA RIBAS BARBOSA

Suscetibilidade de abelhas sem ferrão ao inseticida dimetoato

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

Orientador: Gustavo Ferreira Martins

Coorientadores: Lorena Lisbetd Botina Jojoa

Renan dos Santos Araújo

Figura S1-12 – Dados de sobrevivência das espécies após exposição aguda oral e de contato ao dimetoato.

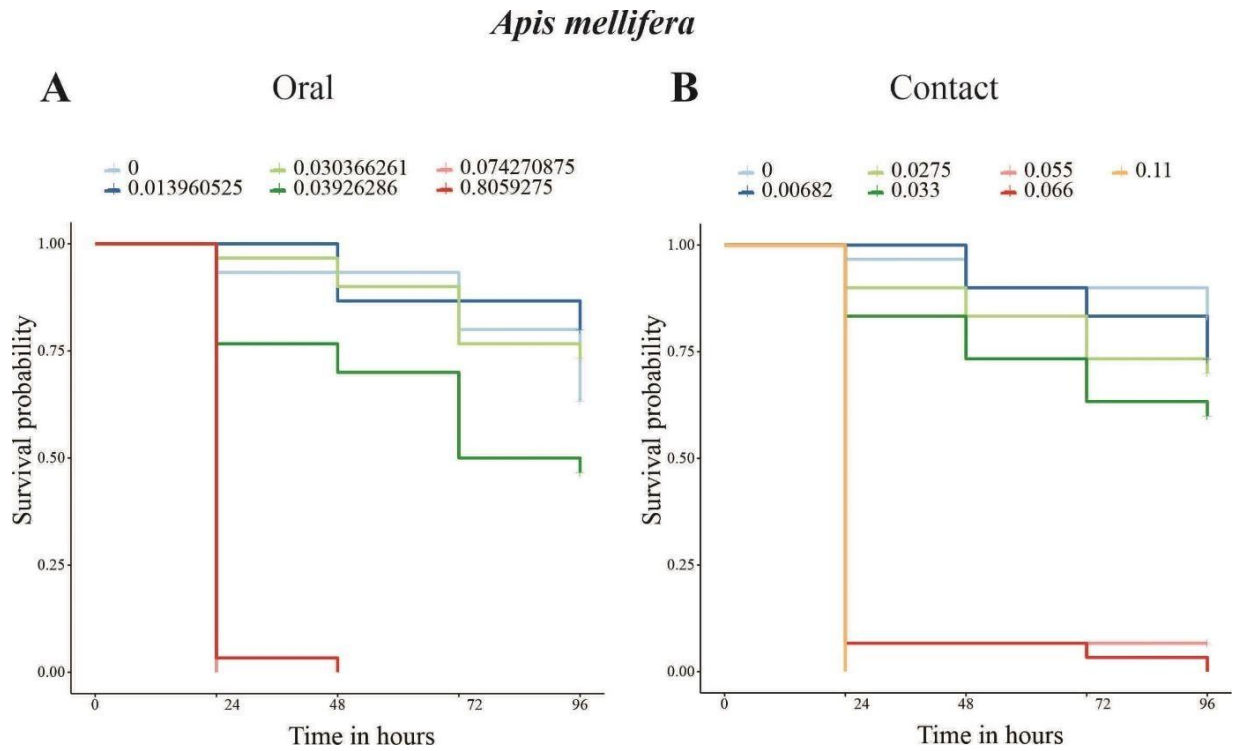


Figura S1: Sobrevivência da espécie *Apis mellifera* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral ao dimetoato por 6h (A) e exposição de contato (B).

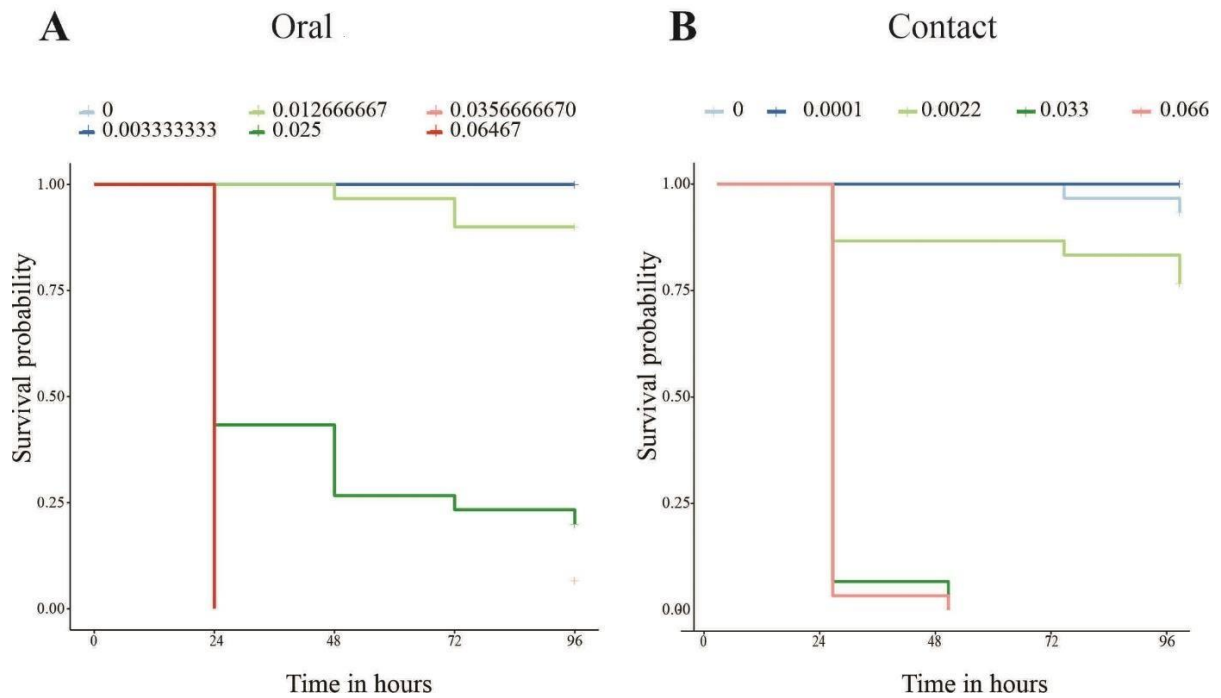
Melipona mondury

Figura S2: Sobrevivência de *Melipona mondury* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral aodimetoato por 6h (A) e por contato (B).

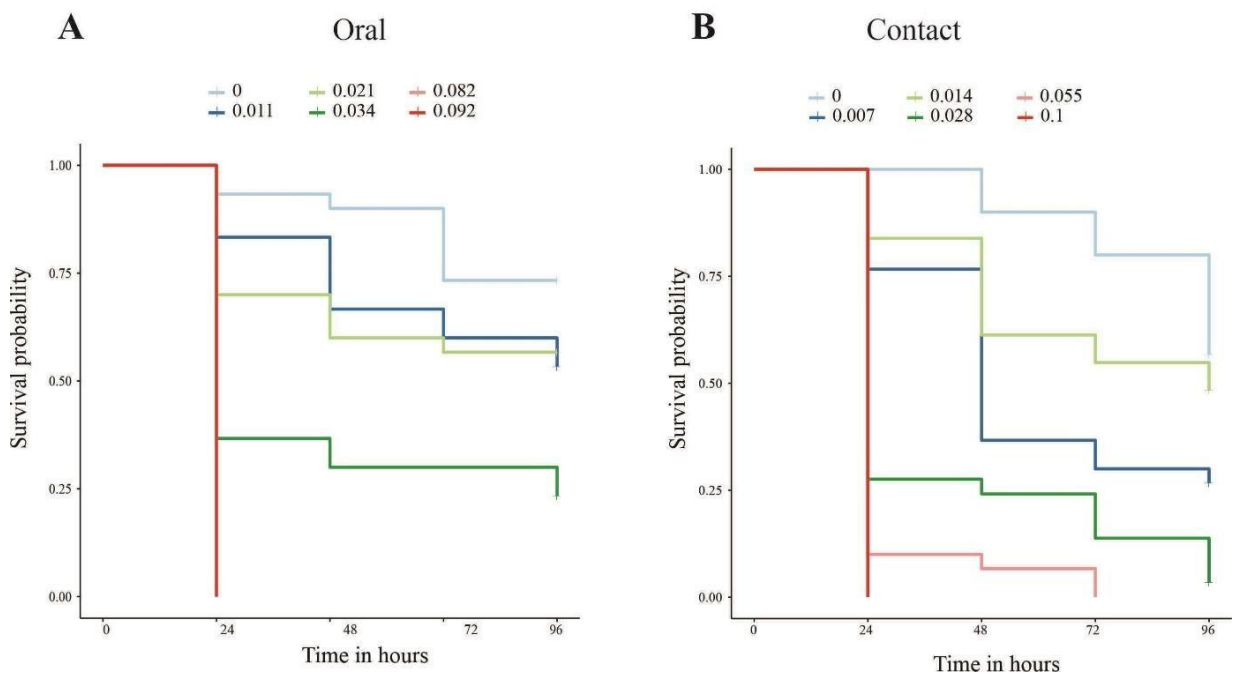
Tetragona clavipes

Figura S3: Sobrevivência de *Tetragona clavipes* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral aodimetoato por 6h (A) e por contato (B).

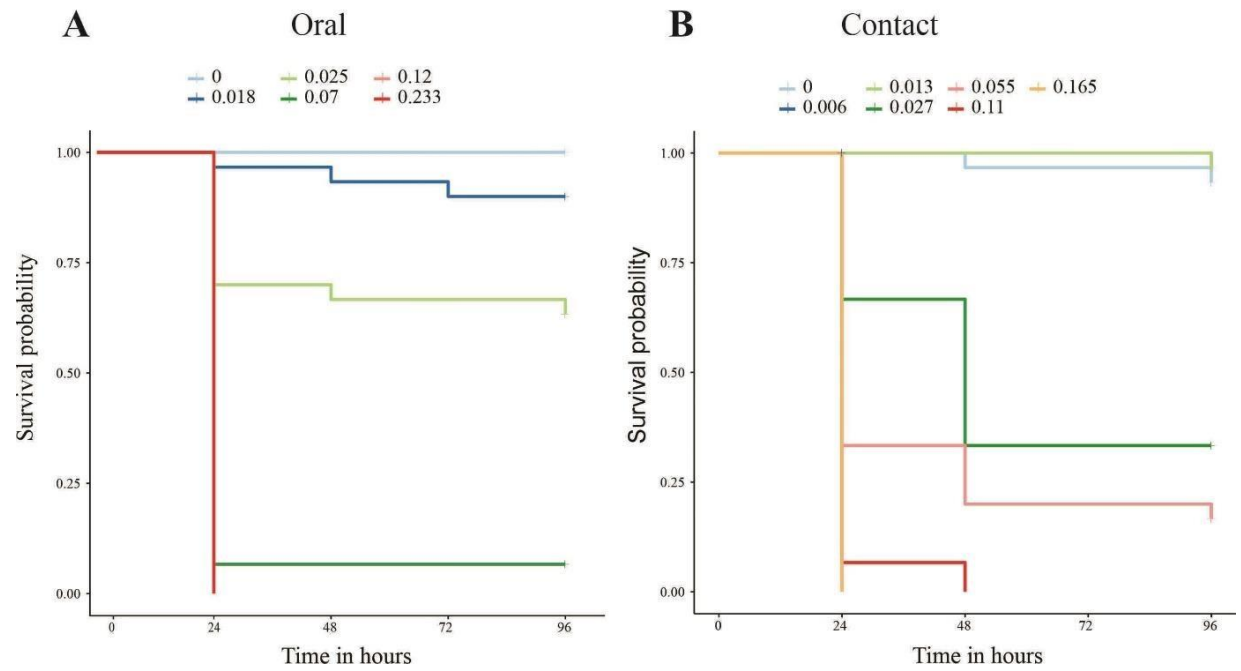
Melipona quadrifasciata

Figura S4: Sobrevivência de *Melipona quadrifasciata* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral ao dimetoato por 6h (A) e por contato (B).

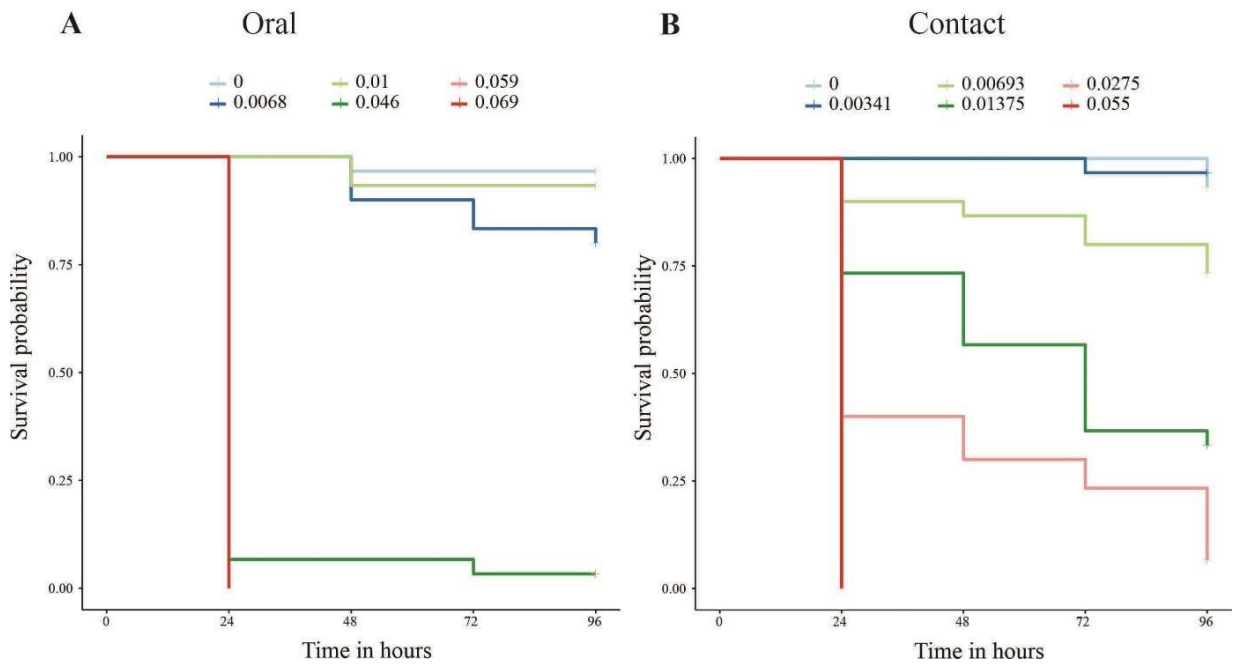
Frieseomelitta varia

Figura S5: Sobrevivência de *Frieseomelitta varia* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral ao dimetoato por 6h (A) e por contato (B).

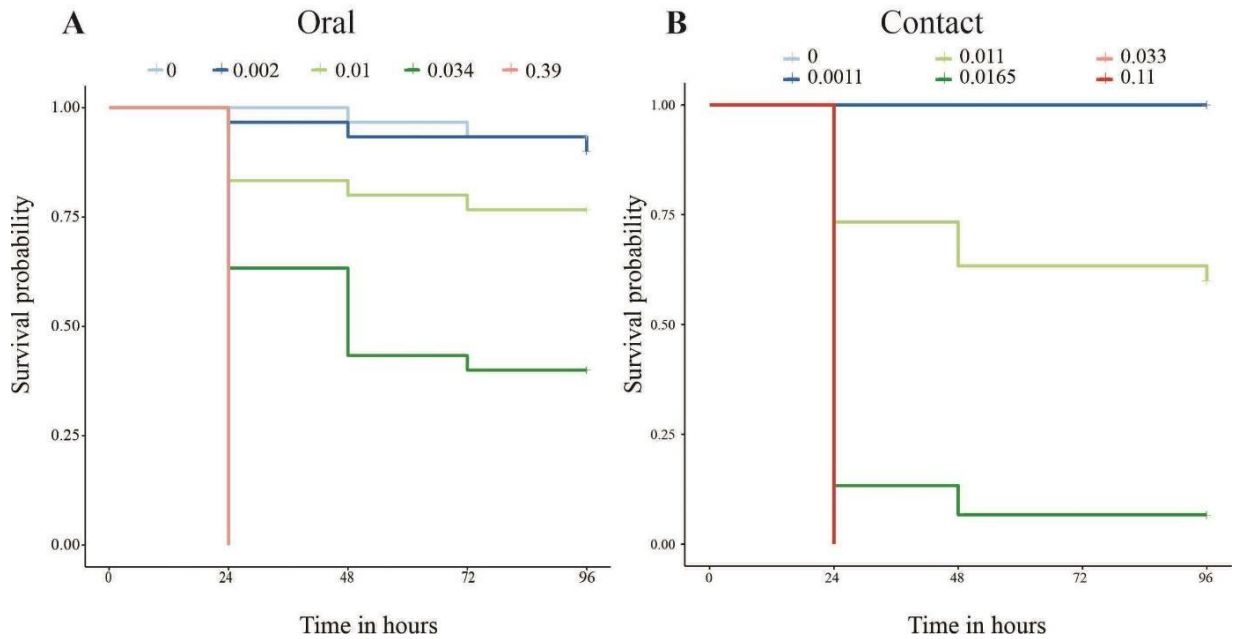
Partamona helleri

Figura S6: Sobrevivência de *Partamona helleri* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral aodimetoato por 6h (A) e por contato (B).

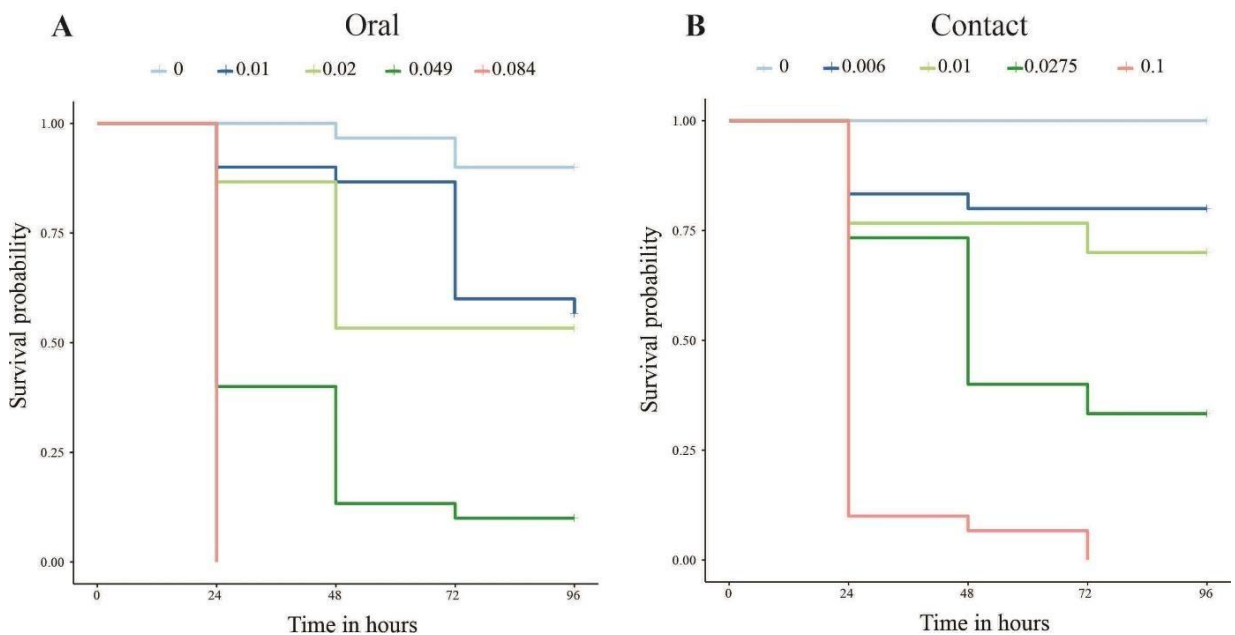
Trigona spinipes

Figura S7: Sobrevivência de *Trigona spinipes* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral aodimetoato por 6h (A) e por contato (B).

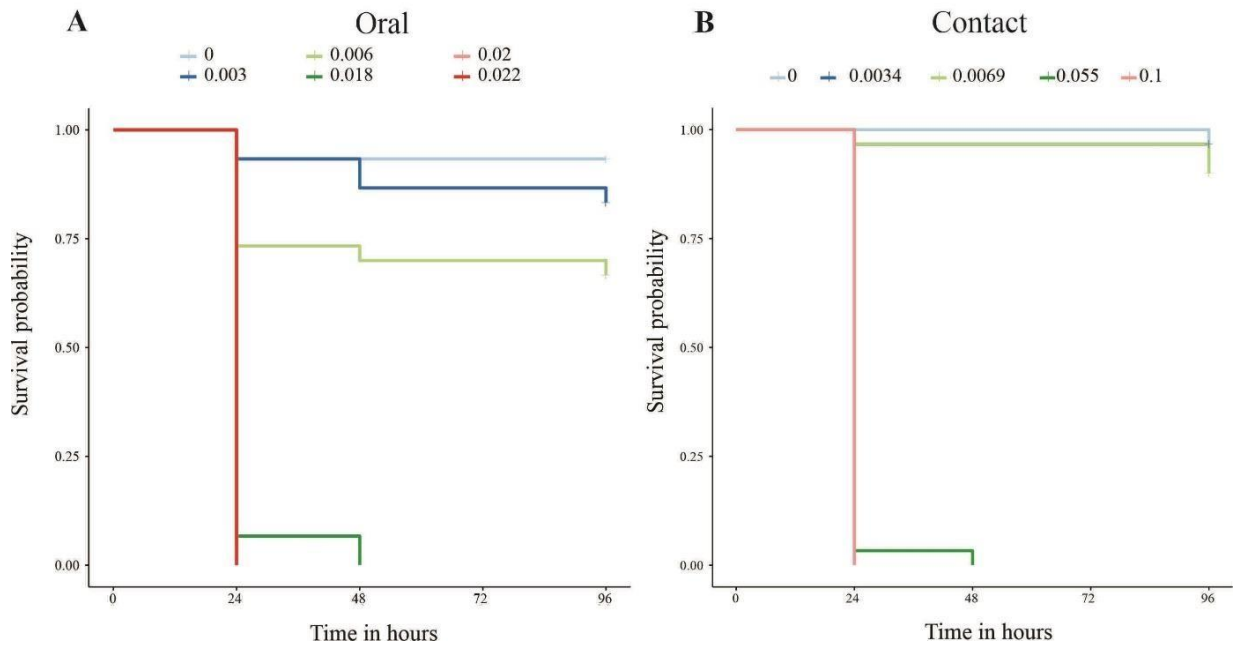
Scaptotrigona xanthotricha

Figura S8: Sobrevivência de *Scaptotrigona xanthotricha* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral ao dimetoato por 6h (A) e por contato (B).

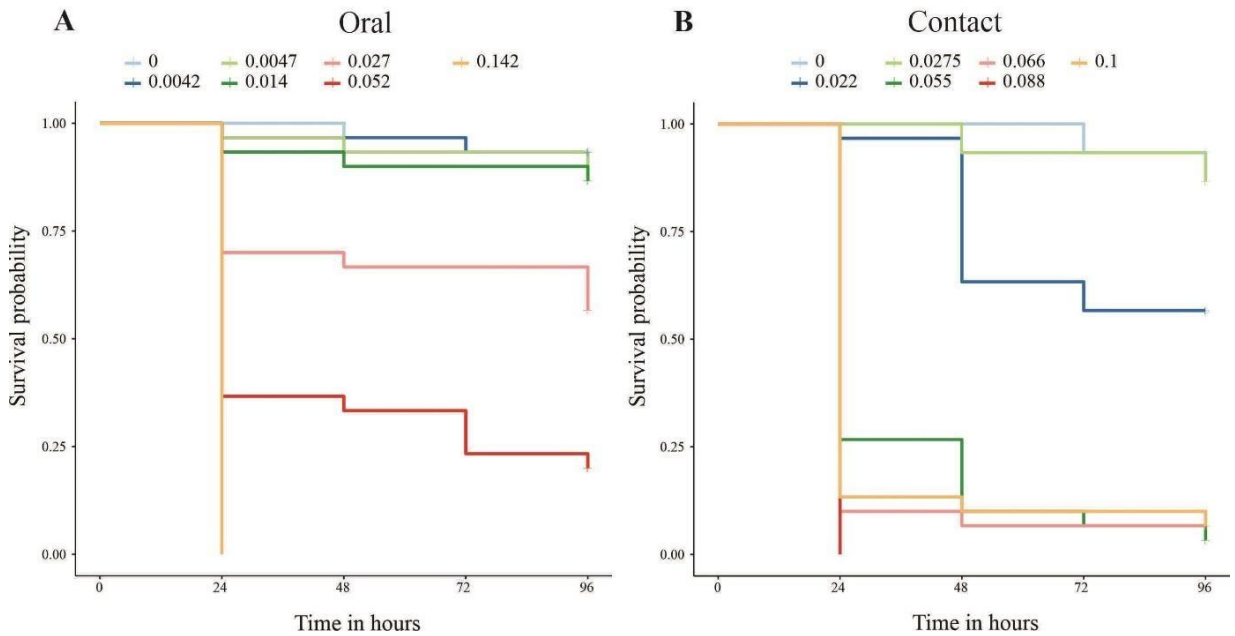
Scaptotrigona bipunctata

Figura S9: Sobrevivência de *Scaptotrigona bipunctata* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição oral ao dimetoato por 6h (A) e por contato (B).

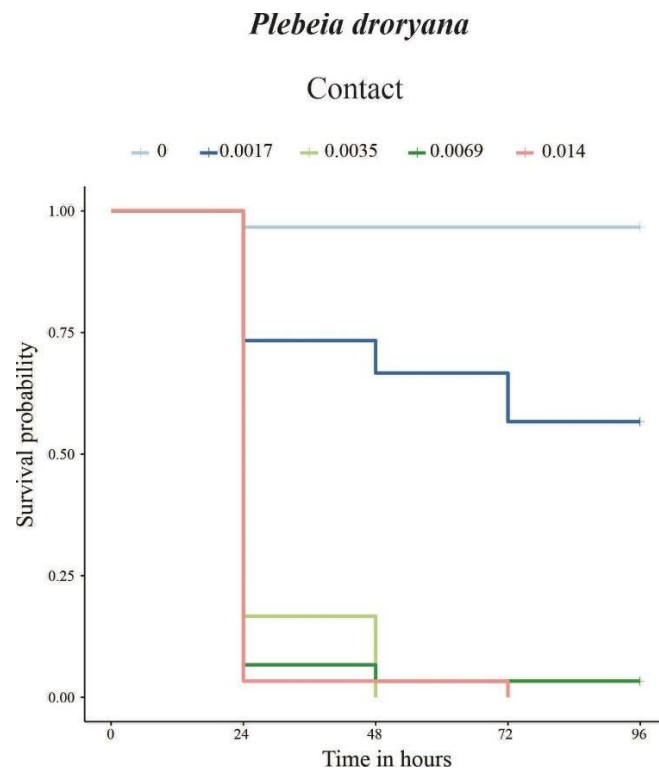


Figura S10: Sobrevivência de *Plebeia droryana* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição por contato ao dimetoato.

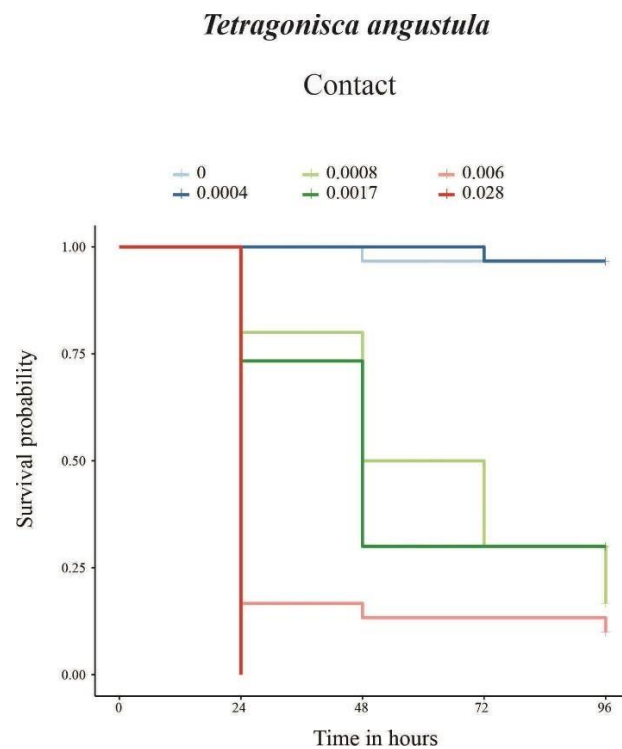


Figura S11: Sobrevivência de *Tetragonisca angustula* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição por contato ao dimetoato.

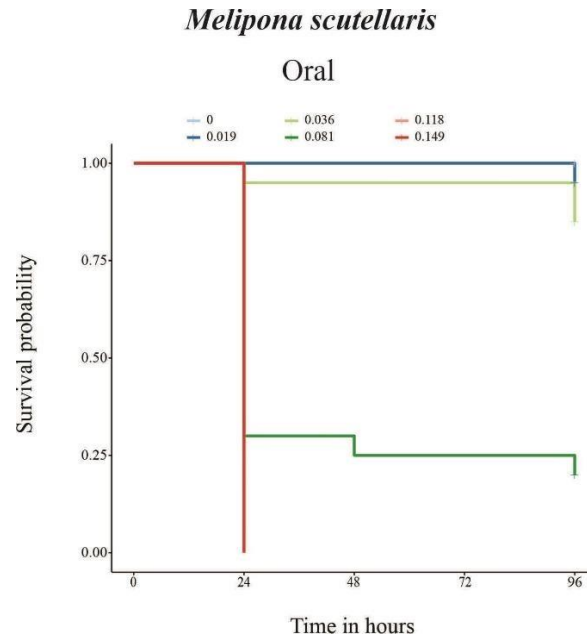
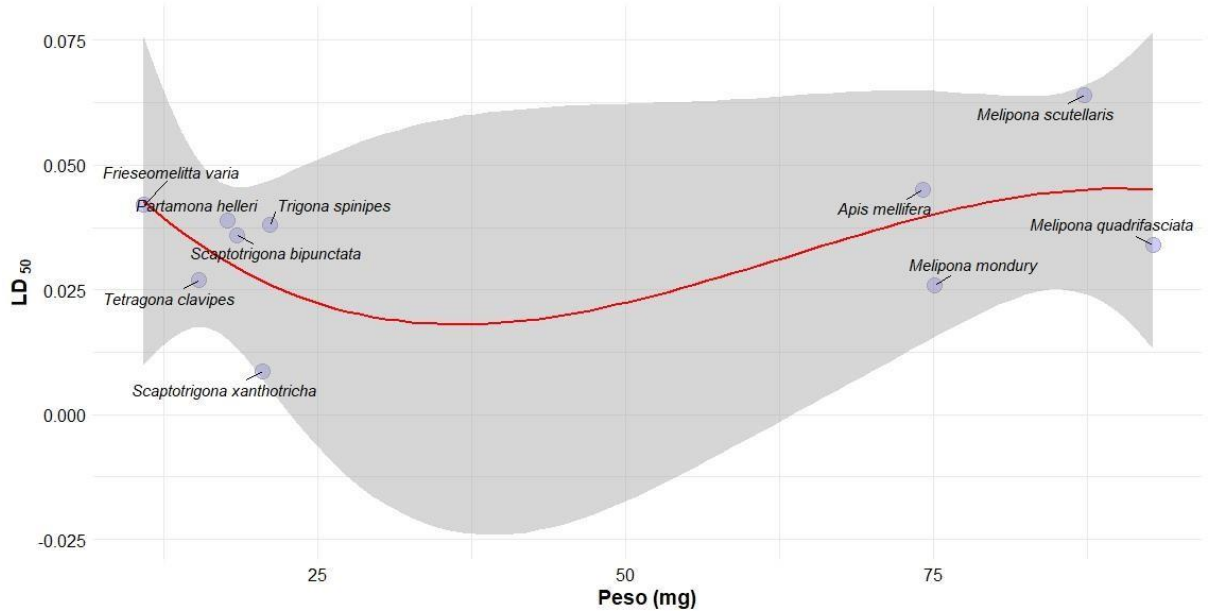


Figura S12: Sobrevivência de *Melipona scutellaris* (24h, 48h, 72h e 96h) após exposição por contato ao dimetoato.

Espécies	Tratamento	DL50 ug/bee	χ^2	DF	p-valor
<i>A. mellifera</i>	Oral	0,04450 (0,04081 – 0,05296)	0,349	3	0,9506
	Contato	0,04054 (0,03725 – 0,04417)	2,7295	4	0,6041
<i>M. quadrifasciata</i>	Oral	0,03421 (0,02939 – 0,04081)	1,6648	3	0,6448
	Contato	0,04095 (0,03435 – 0,04848)	2,8816	4	0,5778
<i>S. bipunctata</i>	Oral	0,03621 (0,02203 – 0,06969)	8,8761	4	0,0643
	Contato	0,03996 (0,03015 – 0,05027)	8,4073	4	0,0777
<i>S. xanthotricha</i>	Oral	0,00877 (0,00721 – 0,01035)	1,5676	3	0,6668
	Contato	0,01945 (0,01366 – 0,02758)	0,0866	2	0,9576
<i>T. clavipes</i>	Oral	0,02717 (0,02189 – 0,03222)	3,0477	3	0,3843
	Contato	0,01165 (0,00890 - 0,01439)	5,938	3	0,1147
<i>P. helleri</i>	Oral	0,03853 (0,02696 – 0,06239)	2,432	2	0,2964
	Contato	0,01273 (0,01150 - 0,01392)	0,0007	3	1,000
<i>F. varia</i>	Oral	0,04223 (0,03351 – 0,04586)	0,1421	3	0,9863
	Contato	0,01961 (0,01633 - 0,02380)	4,5807	3	0,2052
<i>T. spinipes</i>	Oral	0,03765 (0,00884 – 2,35164)	5,3064	2	0,0704
	Contato	0,04100 (0,03188 - 0,05580)	3,2571	2	0,1962
<i>M. mondury</i>	Oral	0,02601 (0,02279 – 0,02912)	3,5538	3	0,3139
	Contato	0,00729 (0,00450 – 0,01119)	0,2995	2	0,8609
<i>T. angustula</i>	Oral	NA	NA	NA	NA
	Contato	0,00200 (0,00153 – 0,00268)	5,3119	3	0,1503
<i>P. droryana</i>	Oral	NA	NA	NA	NA
	Contato	0,00234	5,6985	2	0,0579
<i>M. scutellaris</i>	Oral	0,06432 (0,05322 – 0,0745)	1,33	3	0,722

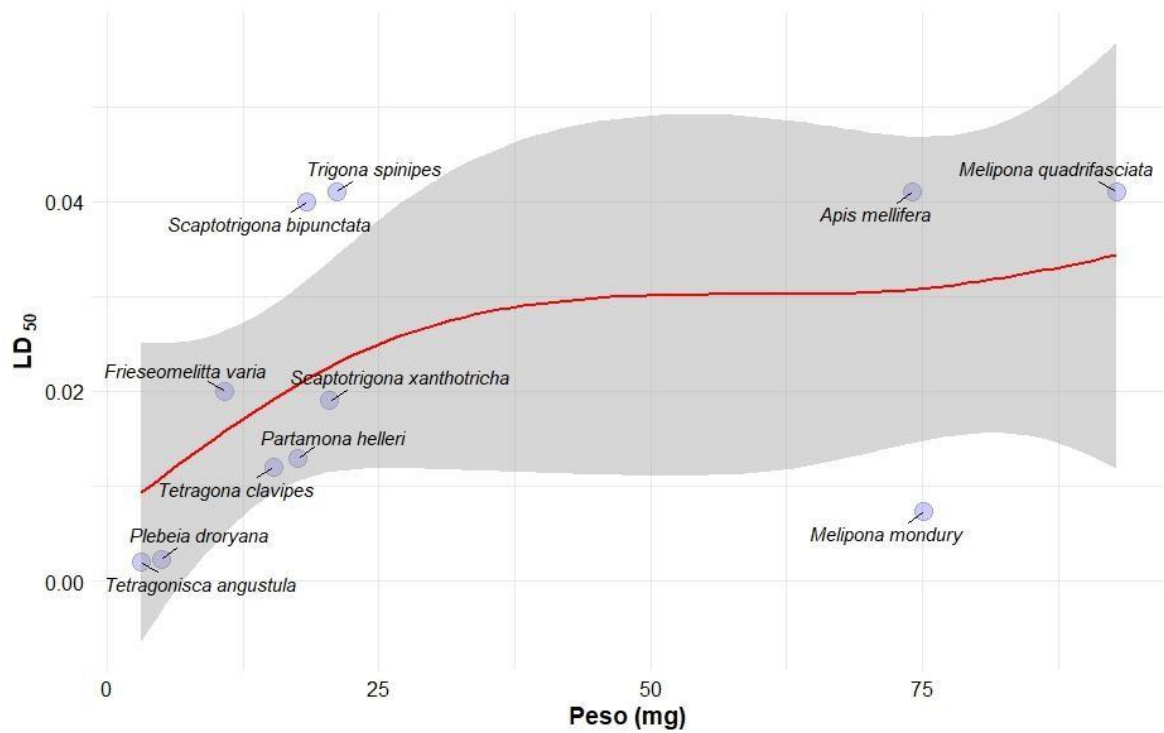
Figura S13 - Toxicidade aguda (CL₅₀-24h) de dimetoato via exposição oral e por contato em abelhas.



1

2 **Figura S14** - Modelo aditivo generalizado via exposição oral (edf = 1, F = 1,31, P = 0,286)

3



4

5

6 **Figura S15** - Modelo aditivo generalizado via exposição contato (edf = 2,19, F = 1,99, P =
7 0,243).