



**JANDER RODRIGUES DE SOUZA**

**TOXICIDADE DA CLOTIANIDINA PARA  
A ABELHA AFRICANIZADA *Apis mellifera*  
LINNAEUS (HYMENOPTERA: APIDAE)**

**LAVRAS - MG  
2015**

**JANDER RODRIGUES DE SOUZA**

**TOXICIDADE DA CLOTIANIDINA PARA  
A ABELHA AFRICANIZADA *Apis mellifera*  
LINNAEUS (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. César Freire Carvalho

Coorientador

Dr. Stephan Malfitano Carvalho

**LAVRAS – MG  
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Souza, Jander Rodrigues de.

Toxicidade da clotianidina para a abelha africanizada *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera:Apidae) / Jander Rodrigues de Souza. – Lavras : UFLA, 2015.

139 p.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): César Freire Carvalho.

Bibliografia.

1. Abelha. 2. Ecotoxicologia. 3. Inseticida. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu orientador(a).

**JANDER RODRIGUES DE SOUZA**

**TOXICIDADE DA CLOTIANIDINA PARA  
A ABELHA AFRICANIZADA *Apis mellifera*  
LINNAEUS (HYMENOPTERA: APIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2015

Dr. Deodoro Magno Brighenti	UFSJ
Dr. Geraldo Andrade Carvalho	UFLA
Dr. Raul Narciso Carvalho Guedes	UFV
Dr. Rogério Antônio Silva	EPAMIG

Dr. César Freire Carvalho  
Orientador

Dr. Stephan Malfitano Carvalho  
Coorientador

**LAVRAS – MG  
2015**

A Deus por sua proteção em todos os momentos.

## **AGRADEÇO**

A minha amada esposa Débora, que esteve ao meu lado nesta longa caminhada, sendo meu pilar para que enfim conseguisse concretizar esse objetivo; com os seus carinhos, aconchego, compreensão, paciência, dedicação, silêncio, incentivo e amor irrefutável.

À família, especialmente você querida irmã Roseane, por seu amor, incentivo e carinho em todos os momentos; e meu pai Edvaldo, pela compreensão, carinho e seu amor.

À família Porto Prado, representados por Sebastião (sempre presente) e Maria Zuleika que me acolheram como um filho, na simplicidade em viver, com apoio, carinho, compreensão e incentivo em todos os momentos; a todos dessa bela família a qual faço parte, minha eterna gratidão.

## **DEDICO**

Querida mamãe Rosvani Rosângela de Souza, mulher humilde e honesta, que com o genuíno e absoluto amor, ensinou-me os princípios da vida; mãezinha jamais esqueceria seu olhar belo e sereno, seus belos olhos verdes, verdes da esperança de que algum dia eu possa reencontrar. Mãe guie meus passos.

Saudade eterna...

**OFEREÇO**

## As abelhas

**Vinícius de Moraes & Luis Enrique Bacalov**

A abelha-mestra  
E as abelhinhas  
Estão todas prontinhas  
Para ir para a festa  
Num zune que zune  
Lá vão pro jardim  
Brincar com a cravina  
Valsar com o jasmim  
Da rosa pro cravo  
Do cravo pra rosa  
Da rosa pro favo  
E de volta pra rosa

Venham ver como dão mel  
As abelhas do céu  
Venham ver como dão mel  
As abelhas do céu

A abelha-rainha  
Está sempre cansada  
Engorda a pancinha  
E não faz mais nada  
Num zune que zune  
Lá vão pro jardim  
Brincar com a cravina  
Valsar com o jasmim  
Da rosa pro cravo  
Do cravo pra rosa  
Da rosa pro favo  
E de volta pra rosa

Venham ver como dão mel  
As abelhas do céu  
Venham ver como dão mel  
As abelhas do céu

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) por meio do Departamento de Entomologia (DEN), pela oportunidade concedida para realização do curso de Doutorado em Agronomia/Entomologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro para realização do projeto de pesquisa.

Aos professores da UFLA, em especial aos professores do Departamento de Entomologia, pelo convívio, amizade e pelos ensinamentos recebidos.

Ao professor César Freire Carvalho, pela oportunidade concedida de realizar o curso de doutorado, a confiança depositada no meu trabalho, os ensinamentos e um pouco da sua experiência transmitidas, enfim pela harmoniosa convivência que tivemos durante esses anos.

Ao professor Stephan Malfitano Carvalho, por sua amizade, com conselhos dos mais diferentes assuntos, sua disponibilidade, sempre prestativo independente do momento, seja no auxílio do doutoramento, tanto na condução e execução dos trabalhos, quanto nas análises e a escrita; ou simplesmente pela consonância que tivemos.

Ao professor Geraldo Andrade Carvalho, eu agradeço pela oportunidade concedida, por incentivar a minha vida científica quando graduando em Agronomia, pelas críticas, paciência e sua dedicação ao longo desses 12 anos, que sem dúvida foram de grande valia para meu crescimento profissional.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem prontamente o pedido, dando sugestões fundamentais para o aperfeiçoamento do trabalho.

Ao pesquisador Fernando Hercos Valicente, por sua amizade, pelas conversas e pelo exemplo de pessoa. Sendo um dos grandes motivadores que tive a graça de conhecer nesta caminhada.

Ao professor Renê Luiz Oliveira Rigitano, por conceder as dependências do Laboratório de Toxicologia de Inseticidas para realização dos experimentos.

Ao professor Osmar Malaspina, por permitir utilizar as instalações do Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista – Rio Claro, e doutoranda Daiana Antônia Torres, por sua paciência em transmitir as informações necessárias referentes à criação de larvas de abelhas, sendo de fundamental importância para realização dessa etapa em meu trabalho.

Ao professor Mario Lúcio Vilela Resende, por conceder as dependências do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo para as análises de atividade enzimática.

Aos colegas do curso de doutorado Adriano Jorge Nunes dos Santos, Ana Maria Calixto Pereira, Bruno Barbosa Amaral, Elisa Judith Guevarra Agudelo, João Luís Ribeiro Ulhôa, Livia Dorneles Audino, Roberta Botelho Ferreira, Pablo da Costa Gontijo e Willian José Rodrigues da Silva, pelos momentos de convivência e alegria.

Ao padrinho Marcelo Mendes Haro, que dividiu comigo, dos momentos tristes que vivemos, as risadas que tivemos, fazendo assim que essa jornada fosse menos árdua, construímos tijolo por tijolo uma grande e sincera amizade.

Ao amigo do curso de pós-graduação Epifânio Porfiro Pires, pela amizade, companheirismo e convivência harmoniosa.

À acadêmica de Zootecnia Daniela Penha Garcia pelo auxílio na realização dos bioensaios, sua ajuda foi de grande valia para realização dos trabalhos.

Aos meus padrinhos Ireni e Júlio Augusto (Julinho), pelo carinho, apoio, atenção e pelos os momentos alegres passados juntos.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia Anderson, Elaine, Érica, Geraldo (Dico), Lea, Lisiane, Nazaré e Viviane, pela amizade e harmoniosa convivência.

Aos integrantes do Núcleo de Estudos em Entomologia (NEENTO), pelos momentos de convivência, risadas e alegrias proporcionadas durante o período.

A todos que de alguma uma forma colaboraram para realização desse trabalho.

**Muito Obrigado.**

## RESUMO GERAL

As abelhas do gênero *Apis* são insetos de extrema importância, seja pela produção de produtos apícolas ou pelo serviço de polinização prestado. Contudo, nos cultivos agrícolas a utilização dos produtos fitossanitários por agricultores não afetam apenas os organismos alvo, mas expõem insetos benéficos, dentre os quais as abelhas. Deste modo, objetivo do trabalho foi determinar a dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) da clotianidina para *Apis mellifera* e avaliar alguns efeitos subletais. Para determinar a DL<sub>50</sub>, foram aplicadas diferentes concentrações de clotianidina no tórax das abelhas, sendo obtido o resultado de 6,67 ng/μL. Posteriormente a determinação da DL<sub>50</sub> realizou-se experimentos para avaliar os possíveis efeitos das doses subletais, utilizando as doses equivalentes a DL<sub>50/400</sub> e a DL<sub>50/20</sub>, além da DL<sub>50</sub> para *A. mellifera*, o tratamento controle foi utilizado apenas acetona. Abelhas campeiras foram expostas a três formas de contaminação: aplicação oral aguda, superfície contaminada e tópica aguda. Também foi avaliado o reflexo da extensão da probóscida de abelhas campeiras contaminadas com a DL<sub>50</sub>, DL<sub>50/400</sub> e a DL<sub>50/20</sub> do inseticida. Em outro bioensaio, os insetos foram contaminados com a DL<sub>50</sub>, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50/400</sub> da clotianidina e foi avaliado a atividade das enzimas acetilcolinesterase, carboxilesterase, fosfatase alcalina e glutathione-S-transferase para lavras de terceiro e quarto ínstar e adultos de *A. mellifera* por meio da absorvância no leitor de placas. Independente da forma de exposição das abelhas, clotianidina reduziu a longevidade dos insetos, da mesma forma que afetou negativamente a resposta da extensão da probóscida. Ao avaliar a atividade das enzimas acetilcolinesterase, carboxilesterase, fosfatase alcalina e glutathione S-transferase em insetos expostos a clotianidina, observou-se alterações resultantes da presença do inseticida. A clotianidina demonstrou ser tóxica para *A. mellifera* quando avaliados aspectos biológicos, bioquímicos e comportamentais. Novos estudos devem ser realizados para confirmação da toxicidade da clotianidina para *A. mellifera* africanizada.

Palavras-chave: Abelha. Ecotoxicologia. Inseticida.

## GENERAL ABSTRACT

Bees belonging the genus *Apis* are extremely important either for their hive products or by providing the pollination service. However, in agricultural fields, the use of pesticides affects not only the target organisms but expose the beneficial insects as for example bees. Thus, the objective of this study was to determine the acute toxicity (LD<sub>50</sub>) of clothianidin to *Apis mellifera* L., 1758 and assess its sublethal effects. The LD<sub>50</sub> was obtained by topical application of clothianidin at different concentrations on bee thorax, being the value estimated of 6.67 ng/bee. Afterward, experiments were done to evaluate the possible effects of the sublethal doses equivalent to 1/400 and 1/20 of the LD<sub>50</sub> and acetone for the control. For the survival assay, three ways of bee contaminations were assessed: topical, oral and contaminated surface. Was also assessed the Proboscis extension reflex as measure to detect any impairment of the cognition ability of bees intoxicated with clothianidin. In another bioassay, insects were exposed to the different doses of clothianidin and the activity of the enzymes acetylcholinesterase, carboxylesterase, alkaline phosphatase and glutathione-S-transferase, were assessed for third and fourth instars of larva and for the adult of *A. mellifera*. Independent of the exposure of bees, clothianidin reduced the longevity of insects and in parts affects negatively the Proboscis extension reflex test. From the study with enzymes, the activities of acetylcholinesterase, alkaline phosphatase, carboxylesterase and glutathione S-transferase in insects exposed to clothianidin, observed changes resulting from the presence of the insecticide. The clothianidin was toxic to *A. mellifera* when evaluated using biological, biochemical and behavioral approaches. However, new studies should be performed to confirm the toxicity of clothianidin to *A. mellifera* Africanized using high tier levels.

Keywords: Honey bee. Ecotoxicology. Insecticide.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ALP	Fosfatase alcalina
AsSCH.I	Iodeto de acetiltiocolina
BSA	Albumina de soro bovino
CaE	Carboxilesterase
CCD	Distúrbio do colapso das colônias (Colony collapse disorder)
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CMB	Cloreto de metil-benzetônio
DL	Dose letal
DTNB	Ácido 5,5'ditio-di (2-nitrobenzóico)
DWV	Vírus da asa deformada (Deformed wing virus)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EL	Extrato de levedura
GSH	L-glutationa reduzida
GST	Glutationa S-transferase
HQ	Coefficiente de risco (hazard quotient)
i.a.	Ingrediente ativo
L1	Larva de primeiro ínstar
L3	Larva de terceiro ínstar
L4	Larva de quarto ínstar
LS	Tampão de extração Low salt
LST	Tampão de extração Low salt Triton <sup>®</sup>
mAChR	Receptor muscarínico da acetilcolina
nAChR	Receptor nicotínico da acetilcolina

PER	Reflexo da extensão da probóscida (Proboscis extension reflex)
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
TL	Tempo letal
UR	Umidade relativa

## LISTA DE SIGLAS

ABEMEL	Associação Brasileira dos Exportadores de Mel
AGROFIT	Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	US Environmental Protection Agency
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
FAO	Food and Agriculture Organization
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NOEL	Não Observação de Efeito Letal
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SINDIVEG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$ -NA	$\alpha$ -naftil acetato
$\beta$ -NA	$\beta$ -naftil acetato
$\rho$ -NPA	$\rho$ -nitrofenilo acetato
$\rho$ -NPP	$\rho$ -nitrofenilo fosfato
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromol
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	Clotianidina
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de potássio
mg	Miligrama
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mM	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO <sup>•</sup>	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OH <sup>•</sup>	Hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
s	Segundo

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> Introdução geral .....	18
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	22
<b>2.1</b>	<b>Bioecologia de <i>Apis</i> sp.</b> .....	22
<b>2.2</b>	<b>Aspectos socioeconômicos de <i>Apis</i> sp.</b> .....	25
<b>2.3</b>	<b>Efeitos de produtos fitossanitários sobre <i>Apis</i> sp.</b> .....	26
<b>2.4</b>	<b>Inseticidas neonicotinoides e a clotianidina</b> .....	29
<b>2.5</b>	<b>Biomarcadores enzimáticos e as abelhas</b> .....	34
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	40
	<b>CAPÍTULO 2</b> Toxicidade da clotianidina para adultos de abelhas africanizadas <i>Apis mellifera</i> .....	52
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	55
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	57
<b>2.1</b>	<b>Obtenção das abelhas adultas</b> .....	57
<b>2.2</b>	<b>Bioensaios dose-mortalidade com adultos de <i>A. mellifera</i></b> .....	57
<b>2.2.1</b>	<b>Determinação da toxicidade aguda da clotianidina para <i>A. mellifera</i></b> .....	57
<b>2.2.2</b>	<b>Bioensaios com <i>A. mellifera</i> expostas a doses subletais de clotianidina</b> .....	58
<b>2.2.2.1</b>	<b>Exposição tópica de doses subletais de <i>A. mellifera</i></b> .....	59
<b>2.2.2.2</b>	<b>Exposição oral de <i>A. mellifera</i> com dieta contaminada</b> .....	59
<b>2.2.2.3</b>	<b>Exposição de <i>A. mellifera</i> a superfície contaminada</b> .....	60
<b>2.3</b>	<b>Efeito de doses subletais da clotianidina no comportamento gustativo de <i>A. mellifera</i></b> .....	60
<b>2.4</b>	<b>Análise dos dados</b> .....	62
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>3.1</b>	<b>Toxicidade aguda da clotianidina para campeiras de <i>Apis mellifera</i></b> .....	63
<b>3.2</b>	<b>Sobrevivência de <i>A. mellifera</i> após aplicação tópica da clotianidina</b> .....	65
<b>3.3</b>	<b>Sobrevivência de <i>A. mellifera</i> após ingestão de alimento contaminado com clotianidina</b> .....	68
<b>3.4</b>	<b>Exposição de <i>A. mellifera</i> em superfície contaminada com doses subletais de clotianidina</b> .....	73
<b>3.5</b>	<b>Reflexo da extensão da probóscida de <i>A. mellifera</i> expostas à doses subletais de clotianidina</b> .....	76
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	82

	<b>CAPÍTULO 3 Abelhas africanizadas <i>Apis mellifera</i> como biomarcadores da presença da clotianidina</b> .....	91
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	94
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	97
<b>2.1</b>	<b>Reagentes</b> .....	97
<b>2.2</b>	<b>Obtenção das abelhas adultas</b> .....	97
<b>2.3</b>	<b>Obtenção de larvas de <i>A. mellifera</i></b> .....	98
<b>2.3.1</b>	<b>Criação <i>in vitro</i> de larvas de <i>A. mellifera</i></b> .....	98
<b>2.4</b>	<b>Exposição de <i>A. mellifera</i> a clotianidina para avaliação enzimática</b> .....	100
<b>2.4.1</b>	<b>Exposição de adultos</b> .....	100
<b>2.4.2</b>	<b>Exposição de larvas</b> .....	100
<b>2.5</b>	<b>Avaliação enzimática de abelhas expostas a clotianidina</b> .....	101
<b>2.5.1</b>	<b>Extração em cabeça e em mesêntero de adultos de <i>A. mellifera</i></b> .....	101
<b>2.5.1.1</b>	<b>Cabeças</b> .....	101
<b>2.5.1.2</b>	<b>Mesêntero</b> .....	101
<b>2.5.2</b>	<b>Extração de larvas de <i>A. mellifera</i></b> .....	102
<b>2.5.3</b>	<b>Quantificação do teor de proteína</b> .....	102
<b>2.5.4</b>	<b>Medições enzimáticas</b> .....	103
<b>2.5.4.1</b>	<b>Acetilcolinesterase (AChE)</b> .....	103
<b>2.5.4.2</b>	<b>Carboxilesterase (CaE)</b> .....	103
<b>2.5.4.3</b>	<b>Fosfatase alcalina (ALP)</b> .....	104
<b>2.5.4.4</b>	<b>Glutathione S-transferase (GST)</b> .....	105
<b>2.6</b>	<b>Análise dos dados</b> .....	105
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	106
<b>3.1</b>	<b>Acetilcolinesterase (AChE)</b> .....	106
<b>3.2</b>	<b>Carboxilesterase (CaE)</b> .....	111
<b>3.3</b>	<b>Fosfatase alcalina (ALP)</b> .....	120
<b>3.4</b>	<b>Glutathione S-transferase (GST)</b> .....	123
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	130
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	131

## **CAPÍTULO 1**

### **Introdução Geral**

## 1 INTRODUÇÃO

A descoberta de fósseis na Europa com aproximadamente 35 milhões de anos marcam os primeiros registros de abelhas do gênero *Apis*, os quais ocorrem naturalmente no continente africano e europeu, bem como no Oriente Médio; em que para sobrevivência desse inseto exigiu uma série de adaptações para os diferentes habitats, condições climáticas e ecológicas (RUTTENER, 1988; SEELEY, 2006).

Devido à sua capacidade de adaptação, entre os séculos dezesseis e dezessete, as abelhas *Apis* sp. foram introduzidas no continente americano e a Oceania, visando à exploração de produtos apícolas como a cera e o mel. Assim, a abelha ocidental como é conhecida *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) é encontrada em praticamente todas as partes do mundo (SEELEY, 2006).

Originárias da Europa, no Brasil as primeiras abelhas desse gênero foram introduzidas no século dezenove, entre as décadas 1830 e 1860, em que as principais subespécies introduzidas foram *Apis mellifera ligustica* Spinola, 1806, conhecida como abelha italiana, *Apis mellifera mellifera* Linnaeus, 1758 a abelha germânica ou negra, e por fim *Apis mellifera carnica* Pollmann, 1879 ou abelha austríaca ou carnoliana ( KERR, 1967; OLIVEIRA CUNHA, 2005).

Desde a introdução das abelhas europeias, devido às condições edafoclimáticas divergentes em relação à Europa, a apicultura brasileira não era competitiva para produção de mel. Visando melhorar a produção em meados da década de 1950, mas precisamente em 1956, o professor Warwick Estevam Kerr trouxe para cidade de Rio Claro (estado de São Paulo) 133 rainhas da subespécie *Apis mellifera scutellata* Lapeletier, 1836, das quais apenas 47 sobreviveram ao transporte. Essas abelhas, de origem africana, na visão do pesquisador poderiam incrementar a produção brasileira de mel, porém, após um ano 26 enxames

dessas abelhas enxamearam dando início ao processo de africanização das abelhas no Brasil, e em grande parte do continente americano, pela formação de políbrido entre insetos de origem europeia e africana (KERR, 1967; OLIVEIRA; CUNHA, 2005; STORT; GONÇALVES, 1979).

Por outro lado e independente da origem, as abelhas são importantes polinizadores de diferentes plantas, inclusive as cultivadas para fins comerciais, contribuindo para a elevação da produção e qualidade das culturas (BROWN; PAXTON, 2009; GALLAI et al., 2009). Entretanto, presente nos campos agrícolas, as abelhas são potencialmente expostas aos produtos fitossanitários, uma vez que na busca por recursos estão em contato direto ou indireto com esses compostos, seja por meio da pulverização direta, resíduos ou ingestão de néctar e/ou pólen contaminados (CLUZEAU, 2002).

A presença desses compostos nos ambientes agrícolas está associada ao cultivo de alimentos em quantidade e com qualidade, onde o agricultor brasileiro utiliza como principal método de controle dos artrópodes-praga, o químico, tornando o Brasil um dos principais mercados de produtos fitossanitários do mundo. Por exemplo, entre os anos de 2006 e 2012, ocorreu aumento de 72%, no consumo desses produtos, saltando de 480 mil para 826 mil toneladas (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA – SINDAG, 2012). Em duas safras apenas, no Brasil ocorreu acréscimo de 2,9 bilhões de dólares no montante comercializado pelo setor, sendo que no ano de 2011 foram comercializados 8,5 bilhões de dólares, no ano seguinte foram 9,7 bilhões de dólares; em 2013 o montante foi de 11,4 bilhões de dólares, ou seja, em dois anos houve incremento de 34% do valor comercializado no setor (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL – SINDIVEG, 2014).

Com o aumento da dependência dos produtos fitossanitários, também aumentaram os relatos que demonstraram os casos de desaparecimento de

abelhas pelo mundo, como os relatos do fenômeno conhecido como “ Colony Collapse Disorder” (CCD). Nesse caso, no inverno de 2006/07 ocorreu nos Estados Unidos o desaparecimento entre 50 e 90% das colônias de forma inexplicável até o presente momento. Coincidentemente, fatos semelhantes foram observados na Europa (COX-FOSTER et al., 2007; KEVAN et al., 2007; VAN ENGELSDORP et al., 2007; VAN ENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

As causas da CCD não foram esclarecidas até o presente momento, contudo algumas hipóteses foram levantadas pela comunidade científica como a presença do ácaro ectoparasita *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000 (Acari: Varroidae) associado com doenças provocadas por vírus, bactérias e/ou protozoários. Outro fator que pode contribuir para ocorrência da CCD são efeitos tóxicos dos inseticidas sobre abelhas (ALAUX et al., 2010; ANDERSON; TRUEMAN, 2000; STOKSTAD, 2007).

Pesquisas vêm sendo realizadas pelo mundo, com o propósito de avaliar os diversos efeitos dos produtos fitossanitários para abelhas. Nos últimos anos, os neonicotinoides estão entre os compostos mais estudados para as abelhas, principalmente a associação com CCD, como também o declínio das colônias. No trabalho realizado por Carvalho et al. (2009), observaram que tiametoxam foi tóxico para *A. mellifera* quando fornecido por alimento contaminado ou em contato com superfície contaminada com o inseticida. Estudo realizado por Chambó et al. (2010) constataram que imidacloprido, outro inseticida neonicotinoide, afetou negativamente a visitação de abelhas na cultura do girassol.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Bioecologia de *Apis* sp.

As abelhas *Apis* sp. são insetos que pertencem à ordem Hymenoptera, subordem Apocrita, superfamília Apoidea, família Apidae e subfamília Apinae (RUTTENER, 1988; TRIPLEHORN; JONNISON, 2011).

Como qualquer inseto holometábolo, as abelhas passam por metamorfose completa durante o desenvolvimento, ou seja, fase de ovo, larva, pupa e adulto (MICHELETTE; SOARES, 1993; SEELY, 2006; WINSTON, 2003).

Os ovos de *Apis* sp. possuem coloração branco-pérola, cilíndricos em forma de bastão, com comprimento entre 1,3 a 1,8 mm e largura entre 320 a 380  $\mu\text{m}$ , tendo volume de 0,10  $\text{mm}^3$ , pesando de 120 a 220  $\mu\text{g}$ . A eclosão do ovo ocorre aproximadamente três dias após oviposição realizada pela rainha (ROBERTS; TABER, 1965; TABER; ROBERTS, 1963; WINSTON, 2003; WOYKE, 1998).

A larva da abelha é vermiforme com a cabeça pouco desenvolvida em relação ao corpo, desprovida de apêndices locomotores, antenas e ferrão, assim como não possui olhos compostos e ocelos. Seu corpo é constituído em grande parte pelo mesêntero, glândulas salivares secretoras de enzimas, glândulas produtoras de seda, tubos excretores e o proctodeu (CRUZ-LANDIM, 2009; WINSTON, 2003).

Durante a fase larval as abelhas passam por quatro ecdises e consequentemente tendo cinco ínstar. As mudas ocorrem a cada 24 horas aproximadamente para operárias, fazendo com que ocorra um rápido crescimento no tamanho das larvas durante esse período, sendo que uma larva de primeiro ínstar pesa entre 110 a 300  $\mu\text{g}$  com cápsula cefálica de 320  $\mu\text{m}$  de

diâmetro em média, enquanto que uma larva de quinto ínstar pesa 24.300 a 126.700  $\mu\text{g}$  com média da cápsula cefálica de 1.490  $\mu\text{m}$  (MICHELETTE; SOARES, 1993).

A larva cessa alimentação no quinto instar e inicia a construção do casulo dentro do alvéolo tecendo a seda; nesse momento elas defecam, pois até o presente momento a passagem do mesêntero para o proctodeu encontrava-se fechada, dando início à pré-pupa (CRUZ-LANDIM, 2009; WINSTON, 2003).

A duração da fase de pupa é variável dentro das castas de *Apis* sp., sendo que para operárias duram doze dias em média, para rainha duram aproximadamente sete dias e para zangão quatorze dias. Nesse período os insetos ficam imóveis no casulo, ocorrendo a metamorfose, assim transformando de larvas em adultos. O tipo de pupa das abelhas é livre ou exarada, sendo possível observar a cabeça, tórax, abdome e os seus apêndices, como as peças bucais, antenas e pernas (WINSTON, 2003).

As abelhas *Apis* sp. são insetos eussociais conferindo basicamente três características peculiares, à sobreposição de gerações na colônias, o cuidado parental com a prole e a combinação entre a cooperação social e o trabalho individual. A colônia tem divisão de tarefas em castas, sendo a estrutura base da sociedade de *Apis* sp. matriarcal com a existência de uma rainha que pode viver por um longo período (1,5 a 2 anos em regiões tropicais), progenitora dos demais integrantes, sendo que as abelhas operárias correspondem a 95% dos insetos, e outros 5% são constituídos de zangões (JAY, 1968; 1970; SEELEY, 2006).

O zangão é o macho das abelhas e tem como função exclusiva a fecundação da rainha, sendo realizada a cópula durante o voo nupcial, em que a rainha é copulada por até 15 machos. A rainha por sua vez possui a função na colônia da oviposição e a manutenção da unidade, principalmente pela liberação dos feromônios ácido (E) 9-oxo-2-decenóico (9-ODA) e ácido (E) 9-hidroxi-2-

decenóico (9-HDA) produzidos por sua glândula mandibular. As operárias executam as diferentes funções conforme a sua idade, fenômeno denominado de “polietismo etário” ou divisão laboral (SEELEY, 2006; WINSTON, 2003).

Em condições brasileiras, aproximadamente 30 dias é o período de vida de uma operária. A primeira função exercida por indivíduos dessa casta é de limpeza dos alvéolos, seguindo de operculação dos alvéolos, alimentação das larvas e companheiras, assim como atender a rainha. De maneira geral, as atividades desempenhadas na colônia ocorrem durante os cinco primeiros dias de vida do inseto. Posteriormente, as operárias manuseiam o pólen e néctar coletados por outras abelhas, constroem e reparam os favos, retiram os detritos, realizam a ventilação e mantêm a temperatura do ambiente, etc., atividades realizadas entre o quinto e vigésimo dia de vida. Por fim, as abelhas operárias exercem as atividades de patrulha e iniciam-se no forrageamento fora da colmeia. Nessa ocasião a abelha campeira, assim denominada devido as atividades fora do ninho, está como mais de vinte dias de idade e irá realizar essas atividades até o fim da sua vida (SEELEY, 2006; WINSTON, 2003).

Como qualquer animal pecilotérmico, a temperatura corpórea das abelhas sofre influência direta do ambiente. Temperaturas baixas ou elevadas reduzem ou inibem as atividades fora do ninho, assim, as abelhas necessitam tanto aquecer quanto resfriar a colmeia. Dentro do ninho a temperatura deve ser controlada, sendo no centro a temperatura variando entre 33 ° a 36 °C, sendo a média de 34,5 °C. Para a colônia é de extrema importância o controle da temperatura, pois superior a 37 °C interrompe a metamorfose e acima de 40 °C os favos de cera começam amolecer e a colônia entra em colapso, e abaixo de 28 °C interferem no desenvolvimento das larvas e a emergência de adultos (SEELEY, 2006).

O controle da temperatura é realizado por meio do agrupamento e dispersão dos insetos associado com os movimentos relacionados ao voo

(articulação das asas), pois quando realizam voo 80% da energia demandada pelas operárias é convertido em calor, devido a processos metabólicos que resultam no aquecimento dos músculos desses insetos, em que para voar as abelhas tem que manter a temperatura torácica acima de 27 °C (ESCH, 1976; HEINRICH, 1979; SEELEY, 2006).

## **2.2 Aspectos socioeconômicos de *Apis* sp.**

Vivendo há milhões de anos no planeta, *A. mellifera* é um importante organismo que é “domesticado” e explorado pelo homem. Acredita-se que os egípcios foram os primeiros a manejarem as abelhas para obtenção de própolis e mel (PEGORARO, 2007).

No Brasil, para a introdução das primeiras abelhas *A. mellifera*, o padre Antônio José Pinto Carneiro necessitou de uma autorização do então imperador Dom Pedro II, sendo comprovado pelo decreto n° 72, de 12 de julho de 1839. Nesse primeiro momento, o objetivo era a exploração da cera para confecção de velas, dando início a apicultura brasileira (WIESE, 2005; ZOVARO, 2007).

A apicultura é uma atividade rentável, podendo ser explorados comercialmente produtos como o mel, cera, própolis, apitoxina, pólen apícola, geleia real e a polinização de plantas cultivadas. Pode-se também citar produtos e serviços especializados para o apicultor como a criação de rainhas (PAULA NETO, 2006; WIESE, 2005).

Em trabalho desenvolvido por Klein et al. (2007), dentre as 124 culturas principais cultivadas pelo homem, 87 são dependes de algum agente polinizador, ou seja 70% das espécies cultivadas de importância econômica para o homem depende de um polinizador, sendo que dentre os principais agentes polinizadores estão as abelhas. Segundo estudo realizado por Gallai et al. (2009), o serviço de

polinização realizado pelos diferentes artrópodes representa cerca de 9,5% do valor total para produção de alimentos.

A produção mundial de mel em 2010 foi estimada em aproximadamente de 1,5 milhão de toneladas, tendo como principais países produtores são a China, Turquia, Argentina, Ucrânia e Estados Unidos. Referente a 2011, os principais exportadores mundiais do produto foram a China, Argentina, México e Índia; enquanto que os principais importadores foram os Estados Unidos, Alemanha, Reino Unido, Japão e França (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO, 2012).

No Brasil a estimativa da produção foi de 38 mil toneladas de mel, sendo que os principais estados produtores foram o Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, Piauí e Minas Gerais, somando 60% de todo mel produzido no país (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2011). Em 2014 o país exportou 25 mil toneladas do produto, sendo que os principais países compradores foram os Estados Unidos, Alemanha, Canadá, Reino Unido e Bélgica (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL – ABEMEL, 2015).

### **2.3 Efeitos de produtos fitossanitários sobre *Apis* sp.**

O aumento na exploração da atividade apícola permitiu o incremento no número de colônias ao longo dos anos. Contudo, as populações das colônias diminuíram consideravelmente na Europa e nos Estados Unidos, sendo notória redução a partir do inverno no hemisfério norte de 2006/07. Hipóteses foram levantadas, como a interferência do homem na estrutura dos habitats, o uso indiscriminado dos produtos fitossanitários, patógenos e as alterações climáticas, com a combinação de um ou mais entre esses fatores para explicar o

desaparecimento das abelhas (AIZEN; HADER, 2009; PETTIS et al., 2012; VAN ENGELSDORP; MEIXNER, 2010).

Nesse sentido, estudos clássicos da exposição tópica de abelhas é uma forma de avaliar a toxicidade de inseticidas, outra forma é por meio da superfície contaminada. Deste modo Stanley et al. (2015) realizaram uma série de experimentos e concluíram que os inseticidas clorpirifós, malationa, profenofós, monocrotofós e deltametrina foram tóxicos a *A. mellifera*, chegando a 100% de mortalidade 48 horas após a intoxicação, enquanto que flubendiamida, metil demeton, imidacloprido e tiametoxam reduziram a sobrevivência somente quando ocorreu a exposição tópica.

Em estudo realizado por Costa et al. (2014), avaliaram três formas de contaminação das abelhas a alguns produtos fitossanitários, a pulverização direta no inseto, o contato com folhas de melão contaminadas com inseticida e o alimento contaminado com os inseticidas. Esses autores constataram que abamectina, tiametoxam e clorfenapir foram extremamente tóxicos para os insetos independente da forma de exposição, enquanto que acetamiprido, cartap e deltametrina foram tóxicos quando pulverizados sobre as abelhas; sendo que o flufenoxuron foi prejudicial quando ofertado em alimento contaminado.

Assim como a exposição dos insetos aos xenobióticos é uma das possíveis razões para ocorrência da CCD ou do declínio das colônias, outro fator a ser considerado é o estado fisiológico dos insetos. As abelhas, por exemplo, podem ser expostas a ações exercidas por agentes infecciosos e potencializadas pela exposição à xenobiótico. Dessa forma, Pettis et al. (2012) observaram que infecções causadas por *Nosema* sp. aumentaram consideravelmente em abelhas expostas ao inseticida imidacloprido, demonstrando provavelmente um efeito indireto do produto fitossanitário sobre o crescimento de patógenos e/ou aumento da susceptibilidade das abelhas a agentes estressantes.

A exposição à xenobióticos também pode causar modificações no comportamento das abelhas, como a capacidade associativa entre uma fonte de recurso, a recompensa (alimento) e o trabalho em grupo (comunicação da fonte de alimento para colônia). Por exemplo, abelhas alimentadas com 0,21 ng/abelha de imidacloprido tiveram a dança do requebrado afetada entre 4,5 a 10,5 vezes. Esse comportamento (dança) é sinal característico para indicar a distância e a localização de fontes de alimento, evidenciando efeito subletal do inseticida (EIRI; NIEH, 2012).

Mas os efeitos tóxicos dos inseticidas não se limitam somente aos insetos adultos. Como modelo, em pesquisa realizada por Zhu et al. (2014), clorotalonil, clorpirifós e fluvalinate foram avaliados individualmente e em combinações, sendo que todos provocaram acréscimo na mortalidade de larvas de *A. mellifera*, bem como a ocorrência de sinergismo entre as moléculas, como no caso de clorotalonil e fluvalinate.

Após o registro do fenômeno CCD, um dos principais fatores estudados são os efeitos letais e subletais dos inseticidas sobre abelhas, uma vez que esses insetos ao realizarem suas atividades podem ser expostos aos compostos. Entretanto, quando se observa a realidade brasileira, os estudos relacionados ainda são incipientes, o que gera a desinformação a respeito dos possíveis efeitos dos produtos fitossanitários sobre os polinizadores na agricultura nacional, impossibilitando almejar a interação entre as atividades apícolas e agrícolas, bem como seu uso racional e sustentável (PINHEIRO; FREITAS, 2010; ROCHA, 2012).

As abelhas *Apis* sp. no Brasil, como já descrito, possuem características peculiares por ser um poliíbrido de espécies europeias e africanas. Um exemplo da diferença entre as espécies foi a pesquisa desenvolvida por Danka et al. (1986), ao avaliarem duas espécies de *Apis*, uma europeia e outra africanizada, submetidas à exposição tópica de azinfos-metil, carbaril, parationa metílica e

permetrina. Constatou-se que a população africanizada foi mais tolerante para três dos inseticidas. Essa característica favorável às abelhas africanizadas pode ser atribuída à fisiologia do inseto, a genética, bioquímica e a diferença de comportamento entre as espécies.

#### **2.4 Inseticidas neonicotinoides e a clotianidina**

Os neonicotinoides são compostos sintéticos que representam a classe de inseticidas análogos da nicotina, presente em folhas de fumo, comumente utilizada no controle de insetos-praga desde o século XVIII. Tanto a nicotina quanto os neonicotinoides atuam na fenda sináptica no processo de transmissão do impulso nervoso, sendo agonistas dos receptores nicotínicos da acetilcolina (ACh). A ACh é o principal neurotransmissor no sistema nervoso central (SNC) dos insetos, cuja ação é modulada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), que interrompe a transmissão do impulso nervoso por meio da hidrólise da acetilcolina em acetato e colina (NAUEN et al., 2001; RIGITANO; CARVALHO, 2001).

Nithiazine foi o primeiro composto sintetizado considerado como neonicotinoide durante a década de 1970; porém, a molécula não foi comercializada em larga escala por ser foto instável. Novos trabalhos foram realizados visando aperfeiçoar a utilização do Nithiazine, sendo que no Japão, a equipe do pesquisador Shinzo Kagabu conseguiu sintetizar o inseticida imidacloprido, o primeiro neonicotinoide comercializado em larga escala (KAGABU, 1997; KLEIER et al., 1985; TOMIZAWA; CASIDA, 2003).

Os inseticidas neonicotinoides são divididos em duas subclasses ou gerações. Os compostos que representam a subclasse das cloronicotinilas (primeira geração) possuem o radical N-ciano-amidina em sua estrutura química, pertencendo a essa subclasse acetamiprido, imidacloprido e tiacloprido. A outra

subclasse dos neonicotinoides é dos tionicotinilas (segunda geração), possuindo o radical N-nitroguanidina e tendo como exemplos os compostos dinotefuran, clotianidina, nitenpiram e tiametoxam (ELBERT et al., 2008; MAIENFISCH et al., 2001; NAUEN et al., 2003).

Pesquisas relacionadas ao metabolismo dos neonicotinoides foram e continuam sendo realizadas em plantas e animais, visto que esses testes são imprescindíveis para o registo de moléculas ou formulação em órgãos regulatórios de diversos países. Para clotianidina, estudos evidenciam que devido à elevada solubilidade em água e metabolismo lento nos mamíferos, praticamente a molécula é excretada na urina de forma inalterada. A evolução química da clotianidina nas plantas é regida por reações metabólicas e fotoquímicas. Por exemplo, o tiametoxam é facilmente convertido em clotianidina no processo metabólico em insetos e plantas o que pode gerar efeito no organismo (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA, 2003; KLEIN, 2003; NAUEN et al., 2003; TOMIZAWA; CAZIDA, 2005; YOKOTA et al., 2003).

Em plantas e animais, a clivagem após a hidroxilação do grupo  $\text{OCH}_2$  do agrupamento nitroguanidina do tiametoxam resulta na formação da clotianidina (CASIDA, 2011; FORD; CASIDA, 2006; NAUEN et al., 2003). A clotianidina por sua vez tem maior afinidade (distância nanomolar) com os receptores nicotínicos da ACh dos insetos em detrimento aos mamíferos (NAUEN et al., 2003). Por sua vez, esses compostos conseguiram combinar a segurança atribuível a uma afinidade mais elevada para insetos e o poder em controlar os insetos-praga (FORD; CASIDA, 2006).

A clotianidina possui fórmula química  $\text{C}_6\text{H}_8\text{ClN}_5\text{O}_2\text{S}$  e nomenclatura IUPAC é (*E*)-1-(2-cloro-1,3-tiazol-5-il-metil)-3-metil-2-nitroguanidina. Esse composto possui massa molecular de 249,68 g/mol, solubilidade em água entre 0,30 e 0,34 g/L a 25 °C, coeficiente de partição octanol/água ( $\log k_{ow}$ ) de 0,7 a

25 °C, o que caracteriza ser um composto polar medianamente hidrofílico. A molécula possui ponto de fusão de 176,8 °C, sendo a fórmula estrutural da clotianidina representada na Figura 1 (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA – ANVISA, 2014; NAUEN et al., 2003; UNEME et al., 2006; TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

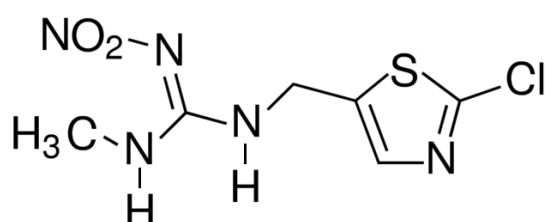


Figura 1 Fórmula estrutural da clotianidina (ANVISA, 2014)

Em 2014 cinco produtos comerciais com o princípio ativo clotianidina detinham registro para serem comercializados no Brasil para o controle de insetos-praga nas culturas da alface, algodão, batata, citros, cana-de-açúcar, crisântemo, feijão, fumo, melão, milho, pepino, repolho, soja, tomate e uva (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITARIOS – AGROFIT, 2014; ANVISA, 2014).

Como a maioria dos inseticidas neonicotinoides, a clotianidina apresenta baixa toxicidade a mamíferos. A dose letal (DL<sub>50</sub>) oral aguda para ratos adultos da nicotina está entre 50 e 60 mg/kg, enquanto que para clotianidina essa dose é maior que 5000 mg/kg. Em pássaros a DL<sub>50</sub> da clotianidina é superior a 2000 mg/kg, considerando-se que um composto será mais tóxico quanto menor for a quantidade ingerida por unidade de peso. Não foram observados efeitos carcinogênicos para mamíferos expostos ao inseticida (TOMIZAWA; CASIDA, 2005).

Segundo a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos, a clotianidina foi extremamente tóxica para abelhas durante a exposição aguda. Outro aspecto está relacionado à exposição crônica dos insetos ao composto. Por causa da capacidade sistêmica, a clotianidina pode translocar na planta e contaminar néctar e/ou pólen, que possivelmente irá provocar efeitos letais e subletais nos insetos que utilizarem esses recursos (EPA, 2003).

As abelhas expostas aos xenobióticos não se encontram sujeitas apenas ao risco de morte, como também podem ocorrer alterações biológicas, fisiológicas e/ou comportamentais. Por exemplo, modificações podem ocorrer no comportamento, aprendizado e/ou em funções vitais para a sobrevivência. Do mesmo modo, alterações na orientação espacial e na capacidade de voo, redução na capacidade associativa fonte-recurso-alimento, bem como a elevação na sensibilidade a *Nosema* sp., alterações no forrageamento ou anomalias no desenvolvimento das fases jovens, podem ser causadas pela exposição de abelhas campeiras aos inseticidas (BLACQUIÈRE et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; HASSANI et al., 2008).

Relatos demonstraram que neonicotinoides interferiram no processo de orientação das abelhas. A memória associativa entre o sinal visual e a recompensa (alimento) foi afetada quando abelhas foram expostas a ingestão de 3 ng/abelha de tiametoxam, ocorrendo redução na resposta ao estímulo superior a 20% dos insetos (DECOURTYE; DEVILLERS, 2010).

Em estudo realizado por Iwasa et al. (2004) ao avaliaram a toxicidade de diferentes neonicotinoides para abelhas operárias, constataram que após aplicação tópica a  $DL_{50}$  foi 18 ng/abelha para imidacloprido, 22 ng/abelha para clotianidina, 30 ng/abelha para tiametoxam, 75 ng/abelha para dinotefuran e 138 ng/abelha para nitenpyram, 7,1 µg/abelha para acetamiprido e 14,6 µg/abelha para tiacloprido. Foi sugerido que a diferenciação da toxicidade dos compostos está relacionada ao arranjo estrutural das moléculas, em que os inseticidas que

contém o agrupamento N-nitroguanidina foram mais tóxicos do que aqueles que continham o agrupamento N-ciano-amidina.

Trabalhos foram publicados com relatos da toxicidade dos neonicotinoides para organismos não alvos, dentre esses as abelhas. Assim, Hassani et al. (2008) avaliaram acetamiprido e tiametoxam ofertando alimento contaminado e exposto as abelhas aos compostos por meio da aplicação tópica, sendo evidenciado que para *A. mellifera* o acetamiprido causou alterações comportamentais dos insetos, todavia os mesmos efeitos não foram observados para tiametoxam.

Analisando a morfologia do intestino médio e da cabeça de abelhas expostas à dieta contaminada com tiametoxam, Oliveira et al. (2014) observaram modificações no lóbulo ótico dos insetos expostos ao tiametoxam, assim como no intestino ocorreu aumento na secreção apócrina e a eliminação celular, bem como teve a vacuolização do citoplasma. Foram constatadas modificações nos corpos penduculados e nos lóbulos óticos do cérebro das abelhas expostas ao inseticida.

O fenômeno CCD e o declínio das colônias levaram a perdas substanciais de colônias de abelhas na Europa e nos Estados Unidos, sendo que diversas hipóteses foram levantadas, e por precaução de governos de diversos países, foram adotadas medidas para minimizar os riscos associados à exposição das abelhas aos inseticidas. Por exemplo, o governo brasileiro em julho de 2012, por intermédio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em caráter cautelar suspendeu a autorização para aplicação por pulverização aérea dos produtos comercializados contendo em sua fórmula os ingredientes ativos clotianidina, fipronil, imidacloprido e tiametoxam (BRASIL, 2012).

Entretanto, em janeiro de 2013, o IBAMA revogou a medida cautelar imposta em 2012 e posteriormente em abril de 2014 o órgão instituiu os

procedimentos de reavaliação agronômica, toxicológica e ambiental desses compostos, seja de forma isolada ou em mistura com outros ingredientes ativos. Essa medida tem como finalidade prevenir a ocorrência de danos ambientais decorrente do emprego desses inseticidas (BRASIL, 2013, 2014).

Dentro deste contexto, pesquisas devem ser realizadas com objetivo de estudar as questões referentes à ação tóxica dos inseticidas sobre os organismos não alvos, o que facilitará a tomada de decisão que irá beneficiar aos apicultores e agricultores.

## **2.5 Biomarcadores enzimáticos e as abelhas**

As abelhas podem ser utilizadas como bioindicadores de contaminação ambiental. Um exemplo é a associação entre a redução da atividade polinizadora com possível exposição ao agente tóxico. A presença de resíduos dos xenobióticos nos produtos apícolas como na cera e no mel, é outra forma de utilizar a abelha ou seus produtos como bioindicadores da qualidade ambiental. Da mesma maneira, a elevação da mortalidade em consequência à exposição de poluentes ambientais, tais como os inseticidas. A avaliação da atividade enzimática é outra técnica resultante do contato do organismo com o agente intoxicante podendo ser relacionada com efeitos relevantes à colônia e a comunidade. Assim, as enzimas produzidas pelas abelhas constituem biomarcadores viáveis para detectar possíveis poluentes (PORRINI et al., 2002; RABEA; NASR; BADAWY, 2010).

A avaliação da poluição ambiental pela utilização de biomarcadores permite observações das respostas dos organismos ao estresse causado pelo componente tóxico, desde nível molecular (bioquímico) até impacto sobre a população e a comunidade (ADAMS et al., 1989; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Dentre as possibilidades da utilização dos biomarcadores esta a avaliação da toxicidade de um composto, bem como os possíveis efeitos subletais de substâncias nos órgãos e/ou tecidos do inseto (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006). A adoção desse método tem como objetivo avaliar possíveis alterações em parâmetros fisiológicos, bioquímicos, anatômicos e comportamentais dos espécimes que sobreviverem à exposição de doses subletais aos xenobióticos (HYNE; MAHER, 2003).

Da mesma forma que em muitos animais, as abelhas possuem um complexo sistema enzimático responsável por diversos processos vitais para sua sobrevivência, principalmente processos envolvendo a desintoxicação, digestão e absorção de nutrientes, transporte, estresse oxidativo entre outros (CHAPMAN, 2013; ROCKSTEIN, 1978).

Transformações metabólicas de xenobióticos resultam em alterações de compostos químicos por meios biológicos. Essas modificações em sua grande maioria podem converter esses produtos em substâncias polares e derivados solúveis em água, sendo excretados pelo organismo (ABOU-DONIA, 2014).

Entre os metabólitos, o acúmulo de peróxidos e radicais livres podem causar problemas como danos da atividade e estrutura celular, citotoxicidade, inclusive no processo de morte celular (apoptose), inibição enzimática e adição de proteína, oxidação do RNA e DNA (KORSLOOT; VAN GESTEL; VAN STRAALLEN, 2004). Radicais livres de oxigênio podem atacar proteínas, ácidos desoxinucléicos e membranas lipídicas, alterando a integridade ou as funções celulares (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993).

São prejudiciais os peróxidos e radicais livres como  $O_2$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $NO^{\bullet}$  e  $H_2O_2$  que são produzidos pelo metabolismo do organismo. A eliminação desses compostos é um das funções mais importantes do sistema enzimático realizado por enzimas como a catalase, superóxido dismutase, glutathione S-transferase,

glutathione peroxidase e glutathione reductase entre outras enzimas (BARREIROS; DAVID, 2006).

Outra enzima importante é a fosfatase alcalina, devido ao seu papel no processo digestivo e transporte de metabólitos, bem como a remoção do agrupamento fosfato de substratos como nucleotídeos, proteínas e alcaloides (COLEMAN, 1992).

Produtos fitossanitários podem causar alterações no complexo enzimático, como a enzima acetilcolinesterase, que é inibida por inseticidas organofosforados e carbamatos, não ocorrendo à hidrólise da acetilcolina, o que ocasiona o acúmulo do neurotransmissor e por consequência leva o inseto a hiperexcitação e a morte (LUKASZEWICZ-HUSSAIN, 2010; RIGITANO; CARVALHO, 2001; STENERSEN, 2004).

Glutathione S-transferase tem papel fundamental na desintoxicação celular e excreção de xenobióticos, sendo utilizada como indicadora da presença de inseticidas e metaloides. Carboxilesterases são indicadores de exposição à piretroides e carbamatos, cuja função é catalisar hidrólises das ligações do agrupamento éster, como em amidas e tioésteres (BLANCHETTE; FENG; SINGH, 2007; HYNE; MAHER, 2003).

Devido à sua importância como um dos principais agentes polinizadores, pesquisadores adotaram as abelhas como um dos bioindicadores, principalmente para presença de produtos fitossanitários, utilizando o complexo de enzimas como biomarcadores. Por exemplo, em trabalho realizado por Carvalho et al. (2013) abelhas adultas foram utilizadas como biomarcadores de três inseticidas, deltametrina, fipronil e espinosade. Foram avaliadas a atividade enzimática da acetilcolinesterase, catalase, fosfatase alcalina, glutathione S-transferase e três isoformas da carboxilesterase. Os inseticidas fipronil e espinosade induziram a atividade da catalase. As enzimas CaE-1 e CaE-2 foram afetadas pela exposição dos insetos à deltametrina. Enquanto o fipronil não

alterou a acetilcolinesterase, assim como a glutathione S-transferase. Já a espinosade alterou praticamente todas as enzimas observadas, exceto a AChE.

Em pesquisa realizada por Boily et al. (2013) foi analisada a atividade da acetilcolinesterase de abelhas contaminadas com doses subletais de imidacloprido, clotianidina e glifosato. Foi observada a elevação na atividade enzimática para os insetos expostos aos neonicotinóides, enquanto ocorreu o declínio da atividade da AChE para os insetos expostos ao glifosato.

Estudo realizado por Badiou-Bénéteau et al. (2012) avaliaram os possíveis efeitos do tiametoxam na atividade enzimática de abelhas expostas a 2,6; 5,1 e 51,2 ng/abelha. Nessa pesquisa foi avaliada a atividade enzimática da acetilcolinesterase, carboxilesterase, glutathione S-transferase, fosfatase alcalina e catalase dos insetos expostos às doses de tiametoxam. As respostas dos biomarcadores revelaram que mesmo na menor dose do inseticida, esse composto afetou a atividade da carboxilesterase, glutathione S-transferase, catalase e fosfatase alcalina, entretanto a acetilcolinesterase não foi modificada pela presença do composto.

Em trabalho realizado por Decourtye et al. (2004) foi observado que o imidacloprido nas doses de 0,12 e 12 ng/abelha aumentou a atividade do citocromo oxidase. A elevação da atividade com citocromo oxidase afetou diretamente a atividade dos neurônios, induziu atividade respiratória e enzimática, assim como atividades das enzimas mitocondriais, conseqüentemente e concomitantemente ocorrerem deficiências no indivíduo, como a aprendizagem (BENNET et al., 1996).

A adoção das abelhas como bioindicadores ambientais é interessante por causa do contato entre o inseto e diversos xenobióticos quando realiza a busca de recursos fora da colônia, sendo considerado como indicador de alta sensibilidade (RABEA; NASR; BADAWY, 2010; SMITH; WILCOX, 1990; WALLWORK-BARBER; FERENBAUGH; GLADNEY, 1982).

O emprego de abelhas como bioindicadores e suas enzimas como biomarcadores aparenta ser uma ferramenta promissora para avaliar a sanidade da colônia e caracterizar a exposição à xenobióticos (CARVALHO et al., 2013).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inseticidas neonicotinoides, como a clotianidina, são amplamente utilizados na agricultura brasileira para o controle de artrópodes-praga. Contudo, poucos são os relatos da ação tóxica desses compostos para abelhas africanizadas *Apis mellifera*, tampouco estudos sobre os possíveis efeitos de doses subletais. É importante salientar a importância socioeconômica das abelhas e a peculiaridade do inseto que é criado no país, tratando-se de um híbrido oriundo do cruzamento entre abelhas europeias e africanas. Da mesma forma deve-se destacar a necessidade de estudos para abelhas nativas, uma vez que essas estão da mesma forma sujeitas a exposição aos inseticidas. Fato preocupante, pois abelhas são extremamente importantes para manutenção da biodiversidade, por meio do serviço de polinização de espécies vegetais. Ao se deparar com essa realidade, estudos devem ser realizados para demonstrar os riscos dos inseticidas neonicotinoides e mitigar os possíveis efeitos tóxicos de inseticidas no campo, bem como adoção de práticas de manejo tanto pelo apicultor, quanto pelo agricultor levando em consideração não somente o efeito letal, mas os efeitos subletais para as abelhas.

Assim, é fundamenta a comunicação entre a indústria, academia e o governo, com objetivo de estimar de forma clara os possíveis riscos causados pelos produtos fitossanitários à saúde das abelhas. Portanto, somente com a união dos setores envolvidos, as respostas para questões serão encontradas e políticas públicas poderão ser adotadas em benefício da sociedade (BLACQUIÈRE et al., 2012).

## REFERÊNCIAS

ABOU-DONIA, M. B. Metabolism and toxicokinetics of xenobiotics. In: DERELANKO, M. J.; AULETTA, C. S. **Handbook of toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2014. chap. 17, p. 618-658.

ADAMS, S. M. et al. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 28, n. 1/4, p. 459-464, 1989.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice monográfico: C64 – Clotianidina**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ae607e0040b365678f1ddff7d85aac/C64+%E2%80%93+Clotianidina.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 15 jun. 2014.

AIZEN, M. A.; HARDER, L. D. The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination. **Current Biology**, London, v. 19, n. 11, p. 915-918, June 2009.

ALAUX, C. et al. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 774-782, Mar. 2010.

ANDERSON, D. L.; TRUEMAN, J. W. H. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. **Experimental and Applied Acarology**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 165-189, Mar. 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL. **Dados da exportação de mel**. Rio Claro, 2015. Disponível em: <[http://brazilletsbee.com.br/inteligencia\\_comercial\\_abemel\\_dezembro\\_2014.pdf](http://brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_dezembro_2014.pdf)>. Acesso em: 29 jan. 2015.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A. et al. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 82, p. 22-31, Aug. 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.

BENNET, M. C. et al. Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity. **Proceeding of the National Academy Science of United States of America**, Washington, v. 93, n. 3, p. 1330-1334, Feb. 1996.

BLACQUIÈRE, T. et al. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, London, v. 21, n. 4, p. 973-992, May 2012.

BLANCHETTE, B.; FENG, X.; SINGH, B. R. Marine glutathione S-transferase. **Marine Biotechnology**, New York, v. 9, n. 5, p. 513-542, Sept./Oct. 2007.

BOILY, M. et al. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 20, n. 8, p. 5603-5614, Aug. 2013.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Comunicado do IBAMA n. 139 de 19 de julho de 2012. Que definiu medidas que possam prevenir a ocorrência de danos ambientais decorrentes de agrotóxicos que contenham o ingrediente ativo Imidacloprido, Tiametoxam, Clotianidina ou Fipronil, isoladamente ou em misturas com outros ingredientes ativos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 19 jul. 2012. Seção 3, n. 139, p.112. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/38800981/dou-secao-3-19-07-2012-pg-112/pdfView>>. Acesso em: 03 fev. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa IBAMA n. 17, de 01 de maio de 2009. Que institui os procedimentos para a reavaliação ambiental dos agrotóxicos, seus componentes afins. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 10 abr. 2014. Seção 3, n. 69, p. 129. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/68880294/dou-secao-3-10-04-2014-pg-129/pdfView>>. Acesso em: 10 set. 2014.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa conjunta n. 1, de 28 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a aplicação dos ingredientes ativos Imidacloprido, Clotianidina, Tiametoxam e Fipronil. **Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 04 jan. 2013. Seção 1, n. 3, p. 10. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/49574999/dou-secao-1-04-01-2013-pg-10/pdfView>>. Acesso em: 03 fev. 2013.

BROWN, M. J. F.; PAXTON, R. J. The conservation of bees: global perspectives. **Apidologie**, Versailles, v. 40, n. 3, p. 410-416, May 2009.

CARVALHO, S. M. et al. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 32, n. 9, p. 2117-2124, Sept. 2013.

CARVALHO, S. M. et al. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 597-606, out./dez. 2009.

CASIDA, J. E. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 7, p. 2923-2931, Apr. 2011.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge University, 2013. 929 p.

CHAMBÓ, E. D. et al. Aplicação de inseticida e seus impactos sobre a visitação de abelhas (*Apis mellifera* L.) no girassol (*Helianthus annuus* L.). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 37-42, 2010.

CLUZEAU, S. Risk assessment of plant protection products on honey bees: regulatory aspects. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. (Ed.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. chap. 3, p. 42-55.

COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 21, p. 441-483, June 1992.

COSTA, E. M. et al. Toxicity of insecticides used in Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie**, Versailles, v. 45, n. 1, p. 34-44, Jan. 2014.

COX-FOSTER, D. L. et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, Washington, v. 318, n. 5848, p. 283-287, Oct. 2007.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. **Science**, Washington, v. 262, n. 5134, p. 689-695, Oct. 1993.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408 p.

DANKA, R. G. et al. Foraging population sizes of africanized and european honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Apidologie**, Versailles, v. 17, n. 3, p. 193-202, 1986.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: THANY, S. H. **Insect nicotinic acetylcholine receptors**. New York: Springer-Verlag, 2010. chap. 8, p. 85-95.

DECOURTYE, A. et al. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 78, n. 2, p. 83-92, Feb. 2004.

EIRI, M.; NIEH, J. C. A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 215, n. 12, p. 2022-2029, June 2012.

ELBERT, A. et al. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 11, p. 1099-1105, Nov. 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticide fact sheet: clothianidin, conditional registration**. Washington, 2003. 19 p. Disponível em: <[http://www.epa.gov/opp00001/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-044309\\_30-May-03.pdf](http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-044309_30-May-03.pdf)>. Acesso em: 03 fev. 2013.

ESCH, H. Body temperature and flight performance of honey bees in a servo-mechanically controlled wind tunnel. **Journal of Comparative Physiology: A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, Berlin, v. 109, n. 3, p. 265-277, Jan. 1976.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat**. Roma, 2012. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/browse/Q/QL/E>>. Acesso em: 10 set. 2014.

FORD, K. A.; CASIDA, J. E. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, n. 11, p. 1549-1556, Nov. 2006.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 810-821, Jan. 2009.

HASSANI, A. K. E. et al. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 54, n. 4, p. 653-661, May 2008.

HEINRICH, B. Thermoregulation of African and European honeybees during foraging attack, and hive exits and returns. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 80, n. 1, p. 217-229, June 1979.

HYNE, R. V.; MAHER, W. A. Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. **Ecotoxicology Environmental Safety**, New York, v. 54, n. 3, p. 366-374, Mar. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, 2011. v. 38, 61 p. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2014.

IWASA, T. et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 5, p. 371-378, May 2004.

JAY, S. C. Factors influencing ovary development of works honeybee under natural condition. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 46, n. 3, p. 345-347, May 1968.

JAY, S. C. The effect of various combinations of immature queen and worker bees on the ovary development of worker honeybees in colonies with and without queens. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 48, n. 1, p. 169-173, Jan. 1970.

KAGABU, S. Chloronicotinyl insecticides discovery, application and future perspective. **Reviews in Toxicology**, Amsterdam, v. 1, n. 7/8, p.75-129, 1997.

KERR, W. E. The history of introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, Johannesburg, v. 39, n. 2, p. 3-5, 1967.

KEVAN, P. G. et al. Colony collapse disorder in Canada: do we have a problem? **Hive Lights**, Calgary, v. 20, n. 2, p. 14-16, May 2007. Disponível em: <<http://www.honeycouncil.ca/documents/2007May.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2014.

KLEIER, D. et al. Novel photoreactions of an insecticidal nitromethylene heterocycle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 33, n. 5, p. 998-1000, Sept. 1985.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Edinburgh, v. 274, n. 1608, p. 303-313, Feb. 2007.

KLEIN, O. Behaviour of clothianidin (TI-435) in plants and animals. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, Leverkusen, v. 56, p.75-101, 2003.

KORSLOOT, A.; VAN GESTEL, C. A. M.; VAN STRAALEN, N. M. **Environmental stress and cellular response in arthropods**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 197 p.

LUKASZEWICZ-HUSSAIN, A. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity: short review. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 98, n. 2, p. 145-150, Oct. 2010.

MAIENFISCH, P. et al. The discovery of thiamethoxam: a second-generation neonicotinoid. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, n. 2, p. 165-176, Feb. 2001.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 303-309, 2006.

MICHELETTE, E. R. F.; SOARES, A. E. E. Characterization of preimaginal development stages in africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L.). **Apidologie**, Versailles, v. 24, n. 4, p. 431-440, 1993.

NAUEN, R. et al. Acetylcholine receptors as site for developing neonicotinoid insecticides. In: ISHAAYA, I. **Biochemical sites in insecticide action and resistance**. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 77-105.

NAUEN, R. et al. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.76, n. 2, p. 55-69, June 2003.

OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 3, p. 389-394, jul./set. 2005.

OLIVEIRA, R. A. et al. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, New York, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, Oct. 2014.

PAULA NETO, F. L. **Apicultura nordestina: principais mercados, riscos e oportunidades**. Fortaleza: Banco de Nordeste do Brasil, 2006. 78 p.

PEGORARO, A. **Técnicas para boas práticas apícolas**. Curitiba: Layer Studio Gráfico, 2007. 130 p.

PETTIS, J. S. et al. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 153-158, Feb. 2012.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 266-281, mar. 2010.

PORRINI, C. et al. Use of honey bees as bioindicators of environmental pollution in Italy. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. (Ed.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. chap. 11, p 186-247.

RABEA, E. I.; NASR, H. M.; BADAWY, M. E. I. Toxic effect and biochemical study of chlorfluazuron, oxymatrine, and spinosad on honey bees (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, n. 3, p. 722-732, Apr. 2010.

RIGITANO, R. L. O.; CARVALHO, G. A. **Toxicidade e seletividade de inseticidas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 72 p.

ROBERTS, W. C.; TABER, S. Egg-weight variance in honey bee. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 58, n. 3, p. 303-306, 1965.

ROCHA, M. C. L. S. A. **Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil**: proposta metodológica de acompanhamento. Brasília: IBAMA, 2012. 88 p.

ROCKSTEIN, M. **Biochemistry of insects**. New York: Academic Press, 1978. 649 p.

RUTTENER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybees**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. 284 p.

SEELEY, T. D. **Ecologia da abelha**: um estudo de adaptação na vida social. Porto Alegre: Paixão, 2006. 256 p.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. **Uso de defensivos é intensificado no Brasil**. São Paulo, 2012. Disponível em: <[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2278](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2278)>. Acesso em: 16 set. 2013.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL. **Sindiveg registra crescimento no setor de defensivos em 2013**. São Paulo, 2014. 2 p. Disponível em: <[http://www.sindiveg.org.br/docs/RELEASE\\_SINDIVEG\\_RESULTADOS\\_2013.pdf](http://www.sindiveg.org.br/docs/RELEASE_SINDIVEG_RESULTADOS_2013.pdf)>. Acesso em: 16 dez. 2014.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSÁNTARIOS. **Clotianidina**. Brasília, 2014. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 25 maio 2014.

SMITH, R. K.; WILCOX, M. M. Chemicals residues in bees, honey and beeswax. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 130, n. 3, p. 188-192, 1990.

STANLEY, J. et al. Evaluation of pesticide toxicity at their field recommended doses to honeybees, *Apis cerana* and *A. mellifera* through laboratory, semi-field and field studies. **Chemosphere**, Oxford, v. 119, p. 668-674, Jan. 2015. Supplement.

STENERSEN, J. **Chemical pesticide: mode of action and toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 296 p.

STOKSTAD, E. The case of the empty hives. **Science**, Washington, v. 316, n. 5827, p. 970-972, May 2007.

STORT, A. C.; GONÇALVES, L. S. A abelha africanizada e a situação atual da apicultura no Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 1, n. 31, p. 32-43, 1979.

TABER, S.; ROBERTS, W. C. Egg weight variability and its inheritance in the honey bee. **Annals of the entomological society America**, College Park, v. 56, n. 4, p. 473-476, 1963.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 247-268, Feb. 2005.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Reviews Entomology**, Palo Alto, v. 48, p. 339-364, Jan. 2003.

TRIPLEHORN, C. A.; JONNISON, N. F. **Estudo dos insetos**. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809 p.

UNEME, H. et al. Discovery and development of a novel insecticide "Clothianidin". **Sumitomo Kagaku**, Tokyo, v. 2, p. 1-15, 2006. Disponível em: <[http://w.sumitomo-chem.co.jp/english/rd/report/theses/docs/20060202\\_h6t.pdf](http://w.sumitomo-chem.co.jp/english/rd/report/theses/docs/20060202_h6t.pdf)>. Acesso em: 03 fev. 2013.

VAN ENGELSDORP, D. et al. An estimate of managed colony losses in the winter of 2006–2007: a report commissioned by the apiary inspectors of America. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 147, p. 599-603, July 2007.

VAN ENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 103, p. 80-95, Jan. 2010. Supplement.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 57-149, Feb. 2003.

YOKOTA, T. et al. Absorption, tissue distribution, excretion, and metabolism of clothianidin in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 24, p. 7066-7072, Nov. 2003.

WALLWORK-BARBER, M. K.; FERENBAUGH, R.W.; GLADNEY, E. S. The use of honeybees as monitors of environmental pollution. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 122, n. 11, p. 770-772, 1982.

WIESE, H. **Apicultura: novos tempos**. 2. ed. Guaíba: Agrolivros, 2005. 378 p.

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Porto Alegre: Magister, 2003. 276 p.

WOYKE, J. Size change of *Apis mellifera* eggs during the incubation period. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 37, n. 4, p. 239-246, Dec. 1998.

ZHU, W. et al. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-11, Jan. 2014. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0077547&representation=PDF>>. Acesso em: 07 out. 2014.

ZOVARO, R. **Cera de abelha: beneficiamento, produção e utilização**. São Paulo: Edição do Autor, 2007. 164 p.

**CAPÍTULO 2 Toxicidade da clotianidina para  
adultos de abelhas africanizadas *Apis mellifera***

## RESUMO

O principal método de controle utilizado para o ataque de artrópodes-praga é a aplicação de produtos fitossanitários. Contudo, outros organismos também são expostos a esses compostos, dentre os quais estão às abelhas do gênero *Apis*, que são insetos de extrema importância, seja pela produção de produtos apícolas ou pelo serviço de polinização prestado. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar a dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) da clotianidina para *Apis mellifera* e avaliar alguns efeitos subletais. Foram aplicadas diferentes concentrações de clotianidina no tórax das abelhas, sendo obtido resultado para DL<sub>50</sub> foi de 6,67 ng/μL. Posteriormente a determinação da DL<sub>50</sub> realizou-se experimentos para avaliar os possíveis efeitos das doses subletais, utilizou-se doses equivalentes a DL<sub>50/400</sub> e a DL<sub>50/20</sub>, além da DL<sub>50</sub> para *A. mellifera*, o tratamento controle foi utilizado apenas acetona. Adultos de abelhas foram expostos a três formas de contaminação: aplicação oral aguda, superfície contaminada e tópica aguda. Também foi avaliado o reflexo da extensão da probóscida das abelhas contaminadas com a DL<sub>50/400</sub>, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub> da clotianidina. A clotianidina reduziu a longevidade dos insetos, independentemente da forma de exposição das abelhas. A resposta da extensão da probóscida foi afetada negativamente pela exposição dos adultos ao inseticida. A clotianidina demonstrou ser tóxico para adultos de *A. mellifera*, necessitando de novos estudos para confirmação da sua toxicidade.

Palavras-chave: Inseticida. Toxicidade aguda. Efeito subletal.

## ABSTRACT

The chemical control is the main tactics for the control of arthropods-pest. However, others organisms are also exposed to these compounds as the bees of the genus *Apis*, which are recognized from its products and for the pollination services. Thus, this study aimed to determine the acute toxicity (lethal dose - LD<sub>50</sub>) of clothianidin to *Apis mellifera* L., 1758 and evaluated some sublethal effects. Using dose-response assay and different concentrations of clothianidin, the LD<sub>50</sub> obtained was of 6.67 ng/bee and the sublethal doses assessed were equivalent of 1/400 and 1/20 of the LD<sub>50</sub>. Adults of *A. mellifera* were exposed to three types of contamination: acute oral, topical acute and contaminated surface. It also assessed the Proboscis extension reflex as way to assess the impact of clothianidin on bee cognition. Our results showing that the intoxication with clothianidin reduces the life span of bees independently the exposure route and from the proboscis extension reflex assay was observed that bees were impaired on cognition ability. In overall, the clothianidin shown to be toxic to adults of *A. mellifera* in laboratorial condition (individuals) and requiring new studies to prove its toxicity at colony/field level

Keywords: Insecticide. Acute toxicity. Sublethal effect.

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) são insetos de grande importância, seja pela exploração comercial de produtos apícolas, ou por serem polinizadores de diversas plantas, incluindo espécies de importância agrícola. Aproximadamente 300.000 espécies de plantas, quase 90% de todas as plantas com flores, requerem a polinização animal para se reproduzir, dentre os quais as abelhas (OLLERTON; WINFREE; TARRANT, 2011). Ao recolher recursos como néctar e/ou pólen, esses insetos são responsáveis pela polinização dessas plantas, sendo que aproximadamente 75% das plantas cultivadas para a produção de alimentos possuem um agente polinizador (KLEIN et al., 2007).

Contudo, para a produção de alimento em quantidade e com qualidade, os agricultores utilizam os produtos fitossanitários como o principal métodos de controle para arthópodes-praga, em que no ano de 2013 apenas no Brasil foram comercializados 11,4 bilhões de dólares em produtos fitossanitários (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL – SINDIVEG, 2014). Porém, a utilização de produtos fitossanitários não se restringe apenas a exposição do organismo alvo, mas como também causa a intoxicação de organismo não alvo, como as abelhas, sendo um dos fatores contribuintes para o declínio das colônias. As causas do declínio parecem envolver múltiplos fatores, incluindo os avanços nas práticas agrícolas (por exemplo, o monocultivo e o uso indiscriminado de produtos fitossanitários), e a interação entre patógenos responsáveis por doenças nas abelhas como o ectoparasita *Varroa* sp. e o microsporídeo *Nosema* sp. com a exposição das abelhas as produtos fitossanitários, podem evidenciam a ocorrência desse fenômeno (ALAUX et al., 2010; STOKSTAD, 2012).

Os possíveis fatores que evidência do declínio dos polinizadores e os possíveis impactos desse acontecimento, demonstram a importância do serviço realizado pelas abelhas para produção de alimentos, sendo que com a perda desses polinizadores, conseqüentemente diminuirá a produção de frutas e hortaliças, abaixo do nível do consumo atual (GALLAI et al., 2009).

A exposição das abelhas a produtos fitossanitários, também pode ocorrer de forma indireta. Pesquisas demonstraram que em ambientes agrícolas, observou-se a presença de produtos fitossanitários em amostras de pólen, néctar e/ou cera apícola (CHAUZAT et al., 2006; KRUPKE et al., 2012). Dentre os produtos fitossanitários encontrados nos produtos apícolas, estão os inseticidas neonicotinoides, inseticida utilizado principalmente para o tratamento de sementes de milho e canola, por exemplo, em que observaram níveis superiores a 0,01 ng da clotianidina (CUTLER; SCOTT-DUPREE, 2007; STEWART et al., 2014).

A realização de trabalhos sobre a ingestão de inseticidas é justificado em função da sistemicidade de compostos, ou seja, a capacidade da substância ser absorvida pelas raízes e folhas e translocar na planta (EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION – EPPO, 2003). Para a clotianidina, um inseticida amplamente utilizado no controle de artrópodes-praga, que permeia as raízes e os tecidos de plantas tratadas, podendo atingir órgãos florais e contaminar o néctar e pólen, os quais são alimentos fundamentais e indispensáveis para manutenção e sobrevivência das abelhas na colônia (ELBERT et al., 2008; RORTAIS et al., 2005).

Assim, com o presente trabalho objetivou-se avaliar a toxicidade do neonicotinoide clotianidina para o híbrido africanizado de *A. mellifera*, bem como avaliar os efeitos de doses subletais em adultos utilizando aspectos biológicos e comportamentais.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção das abelhas adultas**

Para realização dos bioensaios as abelhas africanizadas *A. mellifera* foram obtidas de duas colônias localizadas no apiário do Departamento de Entomologia da UFLA. As abelhas campeiras foram coletadas na melgueira da colmeia equipada com tela excludora, salientando que nos quadros da melgueira não existia a presença de nenhuma fase de desenvolvimento do inseto (ovo, larva ou pupa), apenas o alimento.

### **2.2 Bioensaios dose-mortalidade com adultos de *A. mellifera***

#### **2.2.1 Determinação da toxicidade aguda da clotianidina para *A. mellifera***

Nessa etapa, por meio de experimentos do tipo dose-resposta, a dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) da clotianidina foi determinada para abelhas campeiras. Inicialmente, foi preparada a solução estoque de clotianidina de 1000 ng i.a./ $\mu$ L e posteriormente outras soluções utilizando série de diluição entre 0,001 a 1000 ng i.a./ $\mu$ L do inseticida diluído em acetona.

Com o preparo das soluções, as abelhas foram anestesiadas com  $CO_2$  por 1,5 minuto. Em seguida foram separados 25 insetos por gaiola de 500  $cm^3$  que receberam aplicação tópica no tórax de um  $\mu$ L de uma respectiva solução do inseticida, a qual foi realizada por meio de uma micro seringa acoplada com um dispensador automático. Cada tratamento correspondeu a uma concentração do inseticida, sendo constituído de cinco repetições de 25 abelhas, em que o tratamento controle utilizou somente acetona.

As gaiolas contendo os insetos foram acondicionadas em câmara climática a  $28\pm 2$  °C, UR de  $60\pm 10\%$  e escotofase de 24 horas. A cada 12 horas, o número de abelhas mortas por gaiola e por concentração foi contabilizado até que a última abelha estivesse morta. Posteriormente os dados obtidos foram submetidos à análise estatística para a determinação da  $DL_{50}$  da clotianidina.

### **2.2.2 Bioensaios com *A. mellifera* expostas a doses subletais de clotianidina**

A sobrevivência das abelhas foi avaliada ao longo do tempo após exposição à clotianidina em três formas distintas: ingestão, aplicação tópica e em superfície contaminada.

Para realização de cada bioensaio, as abelhas foram anestesiadas e mantidas nas mesmas condições climáticas descrita no subitem 2.2.1. Em seguida foram contabilizando as abelhas mortas a cada 12 horas até que a última abelha estivesse morta.

Para a definição das doses subletais utilizadas foram considerados resultados descritos na literatura em função de pesquisas com análise de resíduo em diversas matrizes ambientais. Por exemplo, em trabalho desenvolvido por Schneider et al. (2012) foram necessários apenas 0,5 ng/abelha de clotianidina para alterar a atividade de forrageamento, enquanto Cutler e Scott-Dupree (2007) avaliaram néctar e pólen de plantas de canola oriundas de sementes tratadas e constataram resultados residuais inferiores a 0,05 ng. Adicionalmente, a análise de risco de intoxicação foi moderada em função da ingestão média de alimentos pelas abelhas, conforme descrito por Rortais et al. (2005).

Partindo do resultado obtido no subitem 2.2.1, as concentrações/doses adotadas para o estudo como doses subletais foram equivalentes à  $DL_{50/400}$  e  $DL_{50/20}$  do resultado observado para a  $DL_{50}$ . Essas doses foram escolhidas por serem doses realísticas e consideradas como doses subletais do inseticida em

concentrações equivalentes a ppb (parte por bilhão) e ppm (parte por milhão) encontrados em vários trabalhos de análise de resíduos em pólen e néctar florais.

#### **2.2.2.1 Exposição tópica de doses subletais de *A. mellifera***

O bioensaio foi constituído de seis repetições com 25 abelhas por repetição para cada dose utilizada, totalizando 150 insetos por tratamento. Os tratamentos avaliados foram a DL<sub>50/400</sub>, DL<sub>50/20</sub>, DL<sub>50</sub> da clotianidina e o controle (acetona), onde aplicou-se um µL da solução do inseticida sobre as abelhas anestesiadas, de forma idêntica ao subitem 2.2.1. A sobrevivência das campeiras foi avaliada ao longo do tempo igualmente descrito no subitem 2.2.1.

#### **2.2.2.2 Exposição oral de *A. mellifera* com dieta contaminada**

Para realização do bioensaio, 180 insetos foram utilizados por tratamento, sendo 30 abelhas por gaiola de 500 cm<sup>3</sup> e seis repetições por tratamento.

A dieta contaminada foi ofertada em microtubos de centrifugação de 600 µL perfurados na extremidade, sendo estimada a ingestão média de 10 µL de solução de sacarose e água (1:1) para cada inseto, dessa forma cada microtubo continha 300 µL de dieta por gaiola. As concentrações do inseticida correspondente a DL<sub>50/400</sub>, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub> da clotianidina foram ofertadas uma única vez. Após ingestão de todo conteúdo ofertado inicialmente (300 µL), as abelhas foram alimentadas *ad libitum* somente com solução de sacarose isenta do inseticida.

Igualmente como descrito no subitem 2.2.1, a sobrevivência foi avaliada ao longo do tempo até a morte do último espécime.

### **2.2.2.3 Exposição de *A. mellifera* a superfície contaminada**

Para a exposição aos resíduos dos inseticidas em superfície, foi utilizada metodologia descrita por Carvalho et al. (2009), empregando-se gaiolas cilíndricas formadas por duas placas de Petri de 10 cm de diâmetro dispostas uma sobre a outra e fixadas com auxílio de grampos metálicos e fita adesiva. Antes da montagem das arenas, cada face interior das placas recebeu pulverização do inseticida (tratamentos), constituída por concentrações de equivalentes a  $DL_{50/400}$ ,  $DL_{50/20}$  e  $DL_{50}$  da clotianidina em solução aquosa, sendo o tratamento controle utilizado apenas água, por meio de uma torre de Potter (taxa de aplicação de  $1,5 \pm 0,5 \mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-2}$  a  $15 \text{ lb}\cdot\text{pol}^{-2}$ ).

Após a secagem do solvente e montagem das arenas, 180 abelhas por tratamento (12 repetições com 15 abelhas) foram anestesiadas por um minuto com  $\text{CO}_2$  e individualizadas nas arenas. Como alimento foi ofertado *ad libitum* pasta Cândi constituída de 50 g de açúcar de confeitiro e 10 mL de mel. A cada período de 12 horas foi avaliado a mortalidade dos insetos até a morte da última abelha.

### **2.3 Efeito de doses subletais da clotianidina no comportamento gustativo de *A. mellifera***

O processo de aprendizagem é vital para manutenção e desenvolvimento da colônia, visto que em cada momento da vida as abelhas exercem papeis distintos. Uma das formas de avaliar a capacidade cognitiva de *A. mellifera* expostas aos inseticidas é a observação do reflexo de extensão da probóscida (PER) pelo inseto. Para realizar esse bioensaio foram empregadas metodologias descritas por Bitterman et al. (1983) e Decourtye e Pham-Delègue (2002) com algumas adaptações. O total de 120 abelhas campeiras por tratamento foram

anestesiadas por CO<sub>2</sub> por 1,5 minuto e cada uma das abelhas recebeu dorsalmente um µL de uma das soluções da clotianidina, nas concentrações da DL<sub>50/400</sub>, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub>. Posteriormente os insetos foram acomodados em gaiolas de 500 cm<sup>3</sup>, em ambiente controlado com temperatura de 28±2 °C e UR de 60±10% e como alimento foi ofertado como pasta Candi *ad libitum*.

Decorrido 12 horas após aplicação, 30 abelhas por tratamento foram anestesiadas e fixadas em suportes construídos com ponteiros seccionados de micropipeta de 1000 µL, adicionando-se um chumaço de algodão no fundo para evitar o escape do inseto. Posteriormente a fixação das abelhas, cada uma foi avaliada de maneira independente ao PER por meio da exposição à solução aquosa com gradiente crescente de sacarose a 0, 10, 25 e 50%. Entre as concentrações foi oferecida somente água destilada, para evitar falso-positivo. O procedimento foi repetido às 24, 48 e 72 horas após a aplicação do inseticida.

A avaliação do estímulo foi por meio de um bastão com sua extremidade envolvida com algodão imerso na solução açucarada, e exposto próximo de uma das antenas do inseto durante três segundos para realização do teste. O estímulo positivo foi caracterizado quando a abelha distendeu seu aparelho bucal, sendo fornecida uma alíquota do alimento à abelha. Quando não ocorreu nenhum comportamento da abelha foi considerado como negativo. Para evitar falsos condicionamentos durante os ensaios, antes de fornecer a primeira solução de sacarose, para cada inseto foi oferecido água, sendo substituída por outra do mesmo tratamento caso observasse resposta positiva ao estímulo.

## 2.4 Análise dos dados

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, sendo que todas as análises foram realizadas pelo software R® (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

Os dados de mortalidade dos experimentos de determinação da toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) foram submetidos à análise do tipo dose-resposta, empregando-se o pacote “drc” (RITZ; STREIBIG, 2005). Pela análise dos dados, ajustou-se o modelo log-logístico com três parâmetros, demonstrado na equação:

$$f(x) = 0 + \frac{d - 0}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

sendo “d” o limite superior, o “b” o slope no ponto “e”, o que corresponde ao ponto de inflexão da curva e o valor da DL<sub>50</sub>. Deste modo, de posse do modelo matemático, determinou-se o valor da DL<sub>50</sub>, o intervalo de confiança, o qui-quadrado do modelo e grau de liberdade.

Para o estudo de sobrevivência dos adultos, foram realizadas medidas repetidas no tempo e os dados submetidos à análise tipo weibull fazendo uso do pacote “Survival” (THERNEAU; LUMLEY, 2011). Foram calculados os tempos letais 50 (TL<sub>50</sub>) para cada tratamento. Naquelas situações onde ocorreu diferença significativa entre os tratamentos, às médias foram comparadas empregando-se o contraste entre modelos.

Para avaliação do experimento de comportamento gustativo, os dados foram avaliados pela rotina GLM (“Generalized Linear Models”) seguindo distribuição binomial, sendo que em caso de diferença entre os diversos tratamentos, esses foram avaliados por meio de contraste de médias ( $p \leq 0,05$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Toxicidade aguda da clotianidina para campeiras de *A. mellifera*

A dose letal mediana ( $DL_{50}$ ) tópica estabelecida para *A. mellifera* africanizada foi de 6,67 ng/abelha (24 horas) (Figura 1). Os resultados apresentados no presente trabalho divergem daqueles obtido por Iwasa et al. (2004), em que ao avaliarem a exposição tópica de neonicotinoides a *A. mellifera*, observaram que a  $DL_{50}$  da clotianidina foi de 22 ng/abelha. Contudo em outro estudo, o resultado obtido da  $DL_{50}$  foi semelhante ao presente estudo com a toxicidade oral aguda da clotianidina para subespécie *A. m. mellifera* após 24 horas de 6,76 ng/abelha (LAURINO et al., 2013).

O resultado da  $DL_{50}$  (6,67 ng/abelha) obtida no presente estudo divergiu da pesquisa realizada por Laurino et al. (2010), em que os autores determinaram a  $DL_{50}$  oral da clotianidina para abelhas oriundas de três colônias, com resultados entre 3,74 a 4,93 ng/abelha. Em trabalho realizado pela European Commission Health (2005) para *A. mellifera* a  $DL_{50}$  oral da clotianidina foi de 3,79 ng/abelha. Para *A. m. ligustica*, Laurino et al. (2013) constataram que a  $DL_{50}$  para clotiandina foi 1,24 ng/abelha.

Atribui-se essa discordância a possivelmente características por se tratar de subespécies distintas. Salienta-se que nesse estudo foi utilizado um poliíbrido (africanizada) originado entre subespécies europeia e africana, enquanto a maioria dos relatos na literatura é de subespécies europeias (MEDRZYCKI et al., 2013).

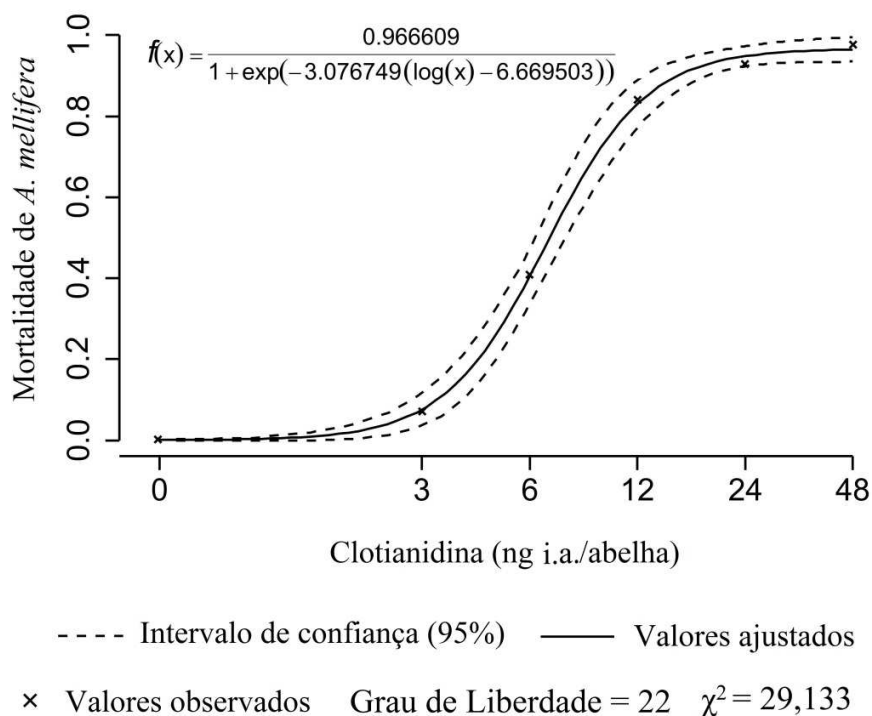


Figura 1 Curva cumulativa da mortalidade de *Apis mellifera* em relação à dose administrada de clotianidina (ng i.a./abelha). LD<sub>50</sub> (Dose letal 50) = 6,67 ng i.a./abelha; Intervalo de confiança 95% = 5.98 – 7.35 ng i.a./abelha.

A variabilidade dos resultados da DL<sub>50</sub> nos bioensaios não se restringe apenas a clotianidina, sendo encontrado na literatura referências de outros inseticidas com discrepância nos resultados obtidos. Por exemplo, quando imidacloprido foi ofertado em alimento contaminado para *A. m. mellifera* a DL<sub>50</sub> observada foi de 193,59 ng/abelha, enquanto que para *A. m. ligustica* foi de 29,79 ng/abelha (LAURINO et al., 2013). Para o trabalho realizado por Carrillo et al. (2013) com *A. mellifera* foi observado a DL<sub>50</sub> oral de 0,1 ng/abelha para imidacloprido. Estudo realizado por Iwasa et al. (2004) encontraram que a DL<sub>50</sub>

para tiametoxam foi de 30 ng/abelha e para tiacloprido de 138 ng/abelha, enquanto Decourtye e Devillers (2010) constataram que a  $DL_{50}$  foi de 5 ng/abelha para tiametoxam e 17.320 ng/abelha para tiacloprido.

As respostas divergentes observadas para  $DL_{50}$  da clotianidina entre o presente estudo com os resultados observados na literatura, podem ser atribuídos à sensibilidade do indivíduo, espécie, origem geográfica, variabilidade genética, idade do inseto, tempo de exposição, modo de exposição, entre outros fatores. Portanto, se o efeito de um composto é avaliado em relação a sua dose, cada indivíduo poderá gerar respostas diferentes daquelas observadas em outros indivíduos (STENERSEN, 2004). Outro fator considerável é que as subespécies não possuem apenas diferenças morfológicas, também possuem diferenças bioquímicas, fisiológicas e comportamentais, sendo possível observar diferenças entre populações, linhagens e colônias das subespécies, uma vez que na maioria dos trabalhos na literatura foram utilizados subespécies de origem europeia, enquanto que no presente estudo foi utilizada uma subespécie poliíbrido africanizado (DANKA et al., 1986; LAURINO et al., 2013; RUTTENER, 1988).

### **3.2 Sobrevivência de *A. mellifera* após aplicação tópica da clotianidina**

Para os insetos do tratamento controle o  $TL_{50}$  foi de 84,00 horas, enquanto para o grupo  $DL_{50/400}$  e  $DL_{50/20}$  (0,01 e 0,34 ng/abelha, respectivamente) a  $TL_{50}$  foi de 63,3 horas, e apenas 49,9 horas foram necessárias para  $DL_{50}$  (6,67 ng/abelha) atingir a  $TL_{50}$ . Passadas 24 horas da contaminação tópica, 80% dos insetos permaneciam vivos; contudo, após 144 horas apenas 20% encontravam-se nesta condição e com 240 horas da exposição foi registrada a morte do último inseto (Figura 2).

Transcorridos 48 horas da intoxicação das abelhas, Halm et al. (2006) observaram que 3,7 ng/abelha de imidacloprido matou metade da população das

abelhas. De maneira semelhante, na presente pesquisa para  $DL_{50}$  (6,67 ng/abelha) da clotianidina apresentou  $TL_{50}$  de 49,9 horas (Figura 2).

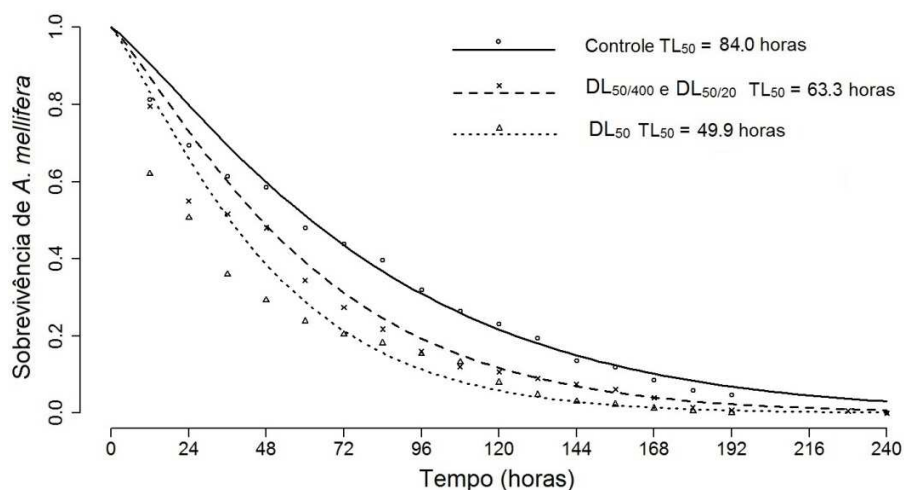


Figura 2 Sobrevivência de *Apis mellifera* expostas à contaminação tópica com diferentes doses de clotianidina.

$$GL = 3. p \geq \chi^2 = 1,082026 e^{-15}$$

$y = \exp((\mu)^{-\alpha} \cdot (x^\alpha))$ , em que  $y$  = sobrevivência;

$\mu = TL_{50}$  (Tempo letal 50);  $\alpha = 1.191895$  e  $x$  = Tempo (horas)

Em estudo realizado por Carvalho et al. (2009), ao avaliarem a toxicidade de produtos comercializados para citricultura brasileira à abelhas africanizadas, constataram que o tiametoxam foi extremamente tóxico quando administrado em pulverização direta, em que duas horas foram suficientes para matar 80% dos insetos, divergindo dos resultados obtidos em que para ocorrer a morte de 80% dos inseto foram necessários no mínimo 96 horas para  $DL_{50}$  da clotianidina (Figura 2).

Avaliando o efeito crônico de doses subletais de imidacloprido, Boily et al. (2013) observaram que para subdose de 0,30 ng/abelha o  $TL_{50}$  foi de 120

horas. Diferente do que foi observado para clotianidina que para  $DL_{50/20}$  (0,34 ng/abelha) o  $TL_{50}$  foi de apenas 63,30 horas (Figura 2), ou seja, a metade do tempo observado pelos pesquisadores.

A clotianidina reduziu a longevidade das abelhas em 25% do tempo, contudo, o tempo de sobrevivência dos insetos foi maior, com  $TL_{50}$  mínimo de 49,9 horas (Figura 2). De modo semelhante aos resultados obtidos nesse estudo, ao pulverizarem tiametoxam sobre abelhas, Costa et al. (2014) constataram redução na longevidade dos insetos, com o  $TL_{50}$  de 6 horas.

No presente estudo realizado, constatou-se que para  $DL_{50/400}$  (0,01 ng/abelha) de clotianidina e passadas 120 horas, mais de 80% dos insetos estavam mortos. Ao avaliar a mortalidade após exposição tópica de abelhas a doses subletais de fipronil, Aliouane et al. (2009) observaram que após 120 horas 40% dos insetos expostos a 0,1 ng/abelha morreram e após 168 horas 80% das abelhas estavam mortas.

Para fipronil (0,01 ng/abelha) e tiametoxam (1,0 ng/abelha e 0,1 ng/abelhas), Aliouane et al. (2009) constataram que os inseticidas causaram mortalidade aproximada de 20% dos insetos após 240 horas. Esses resultados foram divergentes daqueles obtidos para a clotianidina, pois decorridas 63,3 horas, as doses subletais desse composto causaram a mortalidade de 50% dos insetos.

Um dos mecanismos de defesa dos insetos é o tegumento, portanto, para ocorrer à intoxicação por aplicação tópica, o inseticida deve transpor a barreira da cutícula sendo absorvido, distribuído, biotransformado no organismo, que por fim quando não resulta na morte do inseto, o composto ou seus metabólitos são excretados pelo inseto (BROOKS, 1976). Contudo, em alguns casos, o metabólito é tanto tóxico como o composto original, por exemplo, do tiametoxam que um dos seus metabólitos é outro inseticida; a clotianidina (CASIDA, 2011).

Na exposição tópica do inseticida, a forma de penetração dependerá de fatores como o metabolismo do inseto, que influencia a taxa de remoção de inseticida de camadas internas do tegumento. A transferência do produto fitossanitário das camadas externas para as mais internas do tegumento do inseto se dá por meio da difusão, por meio de gradiente de concentração do ambiente mais concentrado para o menos concentrado; em outras palavras, a superfície externa do tegumento torna-se saturada com a exposição tópica do inseticida, que por sua vez percorre para dentro da cutícula onde a concentração da substância se encontra baixa, implicando na intoxicação do inseto e que poderá causar sua morte (BROOKS, 1976; NEGRO, 2011).

### **3.3 Sobrevivência de *Apis mellifera* após ingestão de alimento contaminado com clotianidina**

Foi observado que para  $DL_{50}$  foi necessário apenas 17,7 horas após a oferta da solução de sacarose contaminada para causar a morte de metade da população, enquanto para a concentração  $DL_{50/20}$  a  $TL_{50}$  foi de 43,7 horas, e para  $DL_{50/400}$  o tempo necessário para atingir a  $TL_{50}$  foi de 57,2 horas. Para o controle foram necessárias 67,6 horas para que atingir o  $TL_{50}$  (Figura 3).

As abelhas alimentadas com solução de sacarose contendo doses subletais da clotianidina reduziram sua longevidade (Figura 3). Contudo, os resultados obtidos no presente estudo, divergem daqueles obtidos em pesquisa realizada pela European Commission Health (2005), sendo que a concentração mínima para níveis de não observação de efeito letal (NOEL) foi de 1,024 ng/abelha.

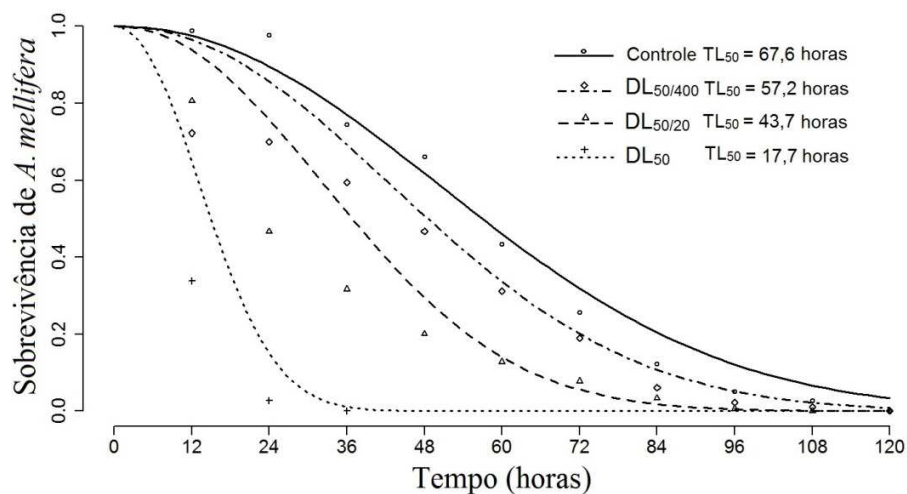


Figura 3 Sobrevivência de *Apis mellifera* alimentadas com dieta contaminada contendo diferentes concentrações de clotianidina.

$$GL = 3. p \geq \chi^2 = 1,169161 e^{-98}$$

$y = \exp((\mu)^{-\alpha} \cdot (x^\alpha))$ , em que  $y$  = sobrevivência;

$\mu = TL_{50}$  (Tempo letal 50);  $\alpha = 2.132196$  e  $x$  = Tempo (horas)

Observou-se que a dose subletal da clotianidina reduziu o TL<sub>50</sub> em 10,4 horas para abelhas expostas a DL<sub>50/400</sub> da clotianidina, da mesma forma que a concentração equivalente a DL<sub>50/20</sub> reduziu em 24,1 horas o TL<sub>50</sub> (Figura 3). A exposição dos insetos aos produtos fitossanitários por meio da via oral ocorre ao coletarem o néctar e o pólen contaminados, mesmo que esses contenham baixa concentração e incapaz de produzir efeitos letais aparentes (JOHANSEN; MAYER, 1990).

No presente estudo observou-se mortalidade superior a 80% nas primeiras 24 horas da oferta do alimento com DL<sub>50</sub> (6,67 ng/abelha) da clotianidina (Figura 4). Corroborando com os resultados observados por Laurino et al. (2011), quando em apenas uma hora após a oferta da concentração de 750 ng/abelha da clotianidina, constatou-se mortalidade da população superior a

80%.

A sobrevivência das abelhas expostas as doses subletais ( $DL_{50/400}$  e  $DL_{50/20}$ ) da clotianidina a sobrevivência foi superior a 50% nas primeiras 24 horas (Figura 3), corroborando com a pesquisa realizada por Laurino et al. (2011), em que constataram que 60% da população alimentada com a dieta com clotiandina (0,75 ng/abelha) contaminada sobreviveram as primeiras 24 horas.

Dos cinco produtos comercializados no Brasil em 2014 que continham como princípio ativo clotianidina, em dois casos o registro de autorizado era para aplicação no tratamento de sementes (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITARIOS – AGROFIT, 2014), ou seja, 40% dos produtos com registro comercializados. No trabalho desenvolvido por Cutler e Scott-Dupree (2007), observaram 0,05 ng de clotianidina em pólen e néctar de canola oriunda de sementes tratadas. Assim, ao se comparar com os resultados da  $DL_{50/400}$  do presente estudo, como os resíduos observados pelos autores em pólen e néctar de canola, a quantidade encontrada no pólen e néctar, foram suficientes para causar redução no  $TL_{50}$  de abelhas alimentadas com dieta contaminada (Figura 3), demonstrando o risco de exposição das abelhas mesmo que em doses subletais em plantas de importância agrícola.

Os resultados obtidos no presente estudo divergem aos obtidos por Aliouane et al. (2009). Ao avaliarem a oferta crônica de doses subletais de acetamiprido e tiametoxam, concluíram que 29% e 10% das abelhas morreram depois de 264 horas da exposição, respectivamente. Enquanto que no presente trabalho todos os insetos morreram em tempo inferior, em 120 horas (Figura 3).

Doses subletais de clotianidina na dieta reduziram a longevidade das abelhas em no mínimo 15% do tempo mediano (Figura 3). Stewart et al. (2014) avaliando sementes de algodão, milho e soja tratadas com clotianidina, observaram níveis entre 0,01 ng a 0,06 ng do neonicotinoide, assim como encontraram níveis de imidacloprido e tiametoxam nas plantas oriundas de

sementes tratadas. Em outro trabalho, para plantas de abóboras foram encontrados no néctar das plantas 0,01 ng para imidacloprido e 0,011 ng para tiametoxam, enquanto que no pólen, foram observados 0,014 e 0,012 ng para imidacloprido e tiametoxam, respectivamente (STONER; EITZER, 2012), demonstrando que mesmo em quantidades subletais os neonicotinoides presentes em pólen e néctar das plantas e podem ser potencialmente nocivos às abelhas, uma vez que as doses subletais da clotianidina reduziu a longevidade das abelhas.

A presença da clotianidina não se restringe apenas às culturas comerciais. Durante o cultivo do milho Krupke et al. (2012) analisaram resíduos de inseticidas nas flores da planta dente de leão, que é encontrada vegetando naturalmente nas entrelinhas da cultura. Essa espécie vegetal é importante recurso floral para as abelhas, tendo sido constatados resíduos de 1,1 ng/g a 9,4 ng/g de clotianidina nas amostras das flores, níveis superiores às doses observadas nesse estudo e que reduziram a longevidade das abelhas (Figura 3).

Avaliando o comportamento de abelhas *A. mellifera* em colônias distantes 2 km de campos de soja e milho com a utilização da clotianidina para tratamento de sementes via solo, Krupke et al. (2012) observaram que todas as abelhas encontradas mortas continham resíduos de clotianidina com índices entre 3,8 ng/g a 13,3 ng/g. No pólen armazenado nos favos das colmeias que não haviam abelhas mortas, foi detectado 2,9 ng/g de clotianidina, enquanto que nas colônias aonde encontrou-se adultos mortos, foi detectado 10,7 ng/abelha, níveis superiores as doses subletais utilizadas nesse trabalho e que se fosse administrados reduziram a longevidade das abelhas (Figura 3).

Uma vez no alimento (néctar ou pólen), as abelhas não tem como evitar a ingestão do inseticida e sua intoxicação. Coletado o néctar contaminado as abelhas campeiras o armazenam no estomodeo, contudo, nessa porção do aparelho digestivo não ocorre absorção de nutrientes, uma vez que toda cutícula

que reveste o intestino anterior é impermeável, embora possa ocorrer digestão por intermédio de microrganismos presentes, ação de enzimas provenientes do sistema salivar ou regurgitadas pelo ventrículo. É no mesêntero que ocorre a digestão propriamente dita, por meio do ventrículo e dos cercos gástricos, onde ocorre praticamente toda digestão e absorção do alimento contaminado ingerido (CHAPMAN, 2013; CRUZ-LANDIM, 2009).

Abaixo da membrana peritrófica no mesêntero, a maior parte das células formadoras é constituída de microvilosidades, cuja principal função é absorção dos nutrientes da digestão, o que facilita absorção do inseticida presente na dieta contaminada. Essas células permitem uma rápida penetração de compostos lipofílicos, incluindo inseticidas (CONNER; WILKINSON; MORSE, 1978; CRUZ-LANDIM, 2009). Devido a essa permeabilidade no intestino médio do inseto, justifica-se o menor tempo necessário para que as concentrações de clotianidina presentes na dieta provocassem a morte de metade da população avaliada quando comparada com a aplicação tópica (Figuras 2 e 3).

Diferente de outras classes de inseticidas, os neonicotinoides são mais tóxicos para abelhas quando exposto pela via oral, se comparada à exposição pelo tegumento. Por exemplo, o  $TL_{50}$  oral observado utilizando  $DL_{50}$  foi de 17,7 horas (Figura 3), enquanto que o  $TL_{50}$  para aplicação tópica foi de 49,9 horas (Figura 2). A diferença nas respostas pelas formas de exposição pode ser atribuída a hidrofobicidade fraca dos inseticidas, o que dificulta os neonicotinoides a penetrarem por meio da cutícula insetos (DECOURTYE; DEVILLES, 2010; IWASA et al., 2004; SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2001).

### 3.4 Exposição de *A. mellifera* em superfície contaminada com doses subletais de clotianidina

O tempo letal mediano foi de 174,67 horas para abelhas expostas às concentrações de DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub> de clotianidina aplicada na superfície de arenas construídas de placas de Petri, enquanto para DL<sub>50/400</sub> foi de 155,71 horas (Figura 4).

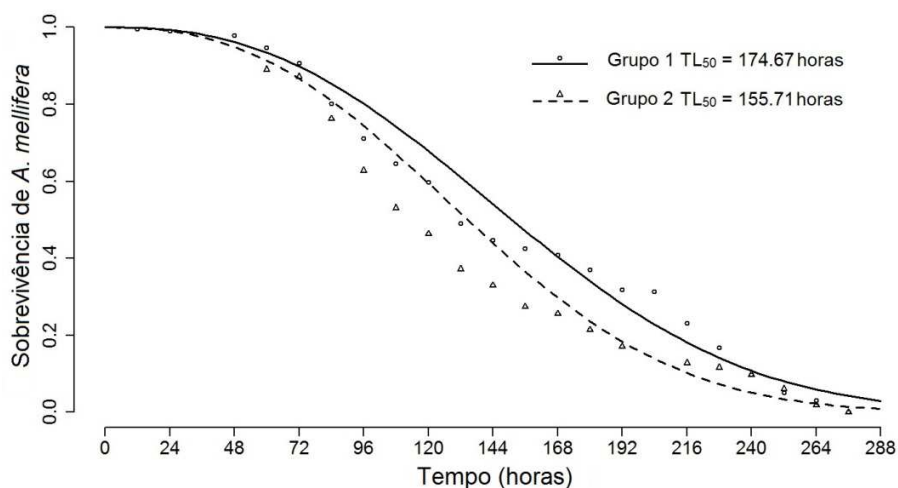


Figura 4 Sobrevivência de *Apis mellifera* mantidas em superfície contaminada com clotianidina em diferentes concentrações.

GL = 3,  $p \geq \chi^2 = 0.0123037$

Grupo 1 = Controle, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub>. Grupo 2 = DL<sub>50/400</sub>.

$y = \exp((\mu)^{-\alpha} * (x^\alpha))$ , em que y = sobrevivência;

$\mu = TL_{50}$  (Tempo letal 50);  $\alpha = 2.518892$  e x = Tempo (horas)

Durante as primeiras 48 horas da exposição das abelhas à superfície contaminada, praticamente não houve registro na mortalidade. Transcorrido 96 horas, 20% dos adultos de *A. mellifera* estavam mortos e após 192 horas aproximadamente 70% dos insetos, sendo registrada a morte do último sobrevivente com 276 horas do início do experimento (Figura 4).

No presente estudo não foram observadas redução na longevidade dos insetos submetidos ao resíduo seco da clotianidina decorridos 48 horas (Figura 4), divergindo do trabalho desenvolvido por Laurino et al. (2011), em que mesmo com metodologia semelhante, contudo empregando folhas de castanheira pulverizadas com diferentes concentrações de clotianidina e thiametoxam, constataram que as concentrações de 750; 375 e 150 ng de clotianidina sobre as folhas de castanheira foram tóxicas para *A. mellifera* causando mortalidade superior a 95% em 24 horas. Igualmente o thiametoxam foi tóxico às abelhas causando a morte de 100% dos insetos 24 horas expostos a 100 ng/mg.

Em estudo realizado por Carvalho et al. (2009) foi observado que o thiametoxam foi extremamente tóxico para abelhas expostas a folhas de citros e a placas de Petri contaminadas, sendo a  $TL_{50}$  de apenas 4 horas, divergindo dos resultados obtidos no presente estudo. Essa diferença possivelmente está relacionada à formulação dos compostos, uma vez que no presente estudo utilizou-se produto técnico, sendo que na pesquisa correlacionada foi utilizado produto formulado. Essa diferença entre os produtos técnicos e os formulados foi o objeto do estudo realizado por Mesnage et al. (2014), os quais realizaram ensaios de citotoxicidade para nove agroquímicos, dentre os quais imidacloprido e acetamiprido. Foi constatado que oito desses compostos formulados, incluindo os neonicotinoides, foram mais tóxicos que seus ingredientes ativos, cuja toxicidade foi atribuída aos adjuvantes existentes na formulação dos produtos comercializados.

As abelhas são susceptíveis à exposição de produtos fitossanitários em todas as castas e em qualquer idade (RORTAIS et al., 2005). Até mesmo larvas são submetidas ao contato com superfície contaminada com inseticidas. Em pesquisa realizada por Wu, Anelli e Sheppard (2011) ao analisarem favos de mel, constataram a presença de 0,035 ng de clotianidina; se fosse comparado com a dose subletal (0,01 ng) do presente estudo que reduziu a longevidade dos

insetos (Figura 4), seria três vezes superior o que poderia prejudicar o desenvolvimento das larvas.

Para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA, o limite residual máximo permitido para produtos formulados com ingrediente ativo clotianidina é de 1,0 ng para culturas como algodão, melão e tomate, via aplicação foliar (AGROFIT, 2014). Contudo, a  $DL_{50}$  obtida no presente estudo foi de 6,67 ng/abelha, sendo seis vezes superior ao permitido, entretanto, o mesmo não afetou negativamente a sobrevivência das abelhas expostas à superfície contaminada (Figura 4). Ressalta-se que ao utilizar  $DL_{50/400}$  (0,01 ng/abelha) em aplicação tópica, observou-se redução na longevidade dos insetos expostos, sendo 100 vezes menor do estipulado pelo MAPA. Essas duas situações evidenciam a necessidade de identificar e quantificar possíveis doses com efeitos subletais, assim como alterações nas funções das abelhas como indivíduo e colônia (COSTA et al., 2014; DECOURTYE et al., 2004; MAYER; LUNDEN, 1986).

A exposição indireta por meio de superfície contaminada é uma das formas de analisar o risco de compostos químicos às abelhas, que pode ser calculado por meio do coeficiente de risco (HQ = hazard quotient). Ele é utilizado para prever se aplicações foliares de um produto fitossanitário têm potencial de causar efeitos adversos às abelhas. O HQ pode ser calculado por meio da taxa de aplicação (g i.a./ha)/ $DL_{50}$  ( $\mu$ g/abelha), sendo HQ menor que 50: assume-se o risco mínimo presumido; HQ maior que 50 potencial risco com grau de preocupação sendo necessário a realização de novos bioensaios (FISCHER et al., 2014; MINEAU et al., 2008).

Assim, pode-se calcular o HQ por contato de abelhas africanizadas utilizando a maior e a menor taxa de aplicação permitida na agricultura brasileira. Por exemplo, a maior dosagem recomendada dentre os produtos comercializados no Brasil cujo princípio ativo é clotianidina, corresponde a 100

g i.a. para cultura do tomateiro, enquanto a menor é de 60 g i.a. para as culturas da alface, melão e pepino (AGROFIT, 2014).

Utilizando a  $DL_{50}$  obtida no presente trabalho de 6,67 ng/abelha ou 0,00667  $\mu$ g/abelha (Figura 2), tem-se  $HQ_{\text{máximo}} = 100 \text{ g i.a./0,00667 } \mu\text{g/abelha}$ ,  $HQ_{\text{máximo}} = 14992$ , ou seja, superior a 50. Para a menor dosagem utilizada tem-se  $HQ_{\text{mínimo}} = 60 \text{ g i.a./0,00667 } \mu\text{g/abelha}$ ,  $HQ_{\text{mínimo}} = 8995$ . Dessa forma tanto a maior quanto a menor dose utilizada foi superior a 50, resultados semelhante aos obtidos pela European Food Safety Authority – EFSA (2013), demonstrando a necessidade da realização de outras avaliações com novos parâmetros para atestar o risco desse composto sobre as abelhas.

O HQ calculado no presente estudo foi de no mínimo 8995, enquanto que em pesquisa realizada por Laurino et al. (2011) foi de 21369, resultado superior ao estimado pela EFSA (2013) para o mínimo risco. Utilizando outra metodologia, Poquet et al. (2014) levaram em consideração a área da superfície contaminada e a área de exposição do corpo das abelhas. O HQ obtido variou entre 17,79 a 36,12, resultado abaixo do limite de risco, o que demonstra que o índice é válido, mas, necessita de aprimoramento.

A determinação do HQ é um passo interessante para se avaliar o risco de um inseticida para abelhas, por permitir extrapolar a razão entre a quantidade de aplicação de inseticidas no campo com o resultado obtido da  $DL_{50}$  para abelhas (POQUET et al., 2014).

### **3.5 Reflexo da extensão da probóscida de *A. mellifera* expostas à doses subletais de clotianidina**

Na oferta da solução de sacarose a 10%, constatou-se resposta positiva inferior a 30% ao estímulo para todos os tratamentos, sendo que para  $DL_{50}$  após 12 horas da aplicação não houve resposta a esse estímulo (Figura 5).

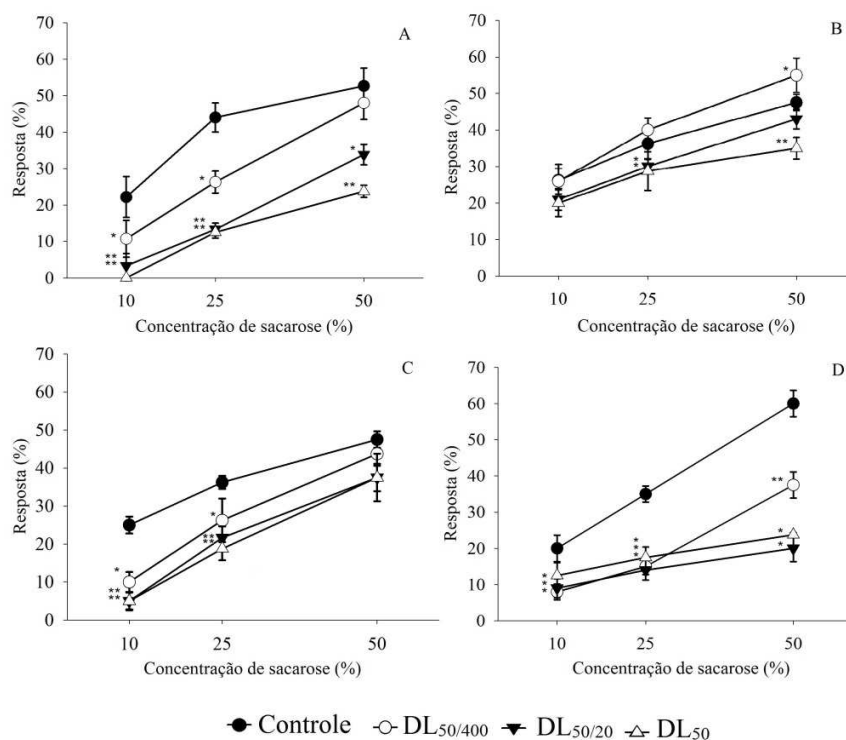


Figura 5 Resposta do reflexo da extensão da probóscida (PER) de *Apis mellifera* expostas à aplicação tópica da DL<sub>50/400</sub> (0,01 ng/abelha); DL<sub>50/20</sub> (0,34 ng/abelha) e DL<sub>50</sub> (6,67 ng/abelha) da clotianidina para os gradientes de sacarose de 10%, 25% e 50%. Erro padrão. A = 12 horas, B = 24 horas, C = 48 horas e D= 72 horas após exposição \* Médias não diferem entre si pelo teste de contraste entre médias ( $p \leq 0,05$ )

Apenas 25% das abelhas expostas a DL<sub>50/400</sub> (0,01 ng/abelha) da clotianidina, responderam a concentração de sacarose de 25% após 12 e 48 horas (Figuras 5A e C). Para 24 horas 40% dos insetos responderam a solução de sacarose, enquanto que às 72 horas da exposição das abelhas, apenas 15% estenderam a probóscide (Figuras 5B e D). Para a DL<sub>50/20</sub> (0,34 ng/abelha) a

resposta positiva não ultrapassou 30% dos insetos, independente do tempo de avaliação (Figura 5).

A resposta ao estímulo para solução de sacarose a 50% foi superior a 45% das abelhas do tratamento controle, independentemente do tempo de avaliação (Figura 5). Decorridos 12 e 24 horas, aproximadamente 45% dos insetos expostos a  $DL_{50/400}$  da clotianidina (0,01 ng/abelha) responderam a solução de sacarose (50%) (Figuras 5A e B). Para abelhas submetidas à exposição tópica de  $DL_{50/20}$  (0,34 ng/abelha) transcorridas 24 horas, 43% dos insetos responderam positivamente ao estímulo (solução de sacarose 50%) (Figura 5B), enquanto que após 72 horas apenas 20% dos insetos estenderam a probóscide quando estimulados (solução de sacarose 50%) (Figura 5D). Para a  $DL_{50}$  (6,67 ng/abelha) independentemente do tempo e do gradiente da solução de sacarose avaliado, a resposta ao estímulo foi inferior a 40%.

Igualmente a dose letal, as doses subletais da clotianidina reduziram a capacidade de percepção do alimento (Figura 5) evidenciando que os estudos com inseticidas não resultam somente em identificar o efeito letal às abelhas, mas também é imprescindível quantificar os possíveis efeitos subletais associados às alterações nas funções cognitivas das abelhas (COSTA et al., 2014; DECOURTYE et al., 2004; MAYER; LUNDEN, 1986).

A clotianidina, bem como outros inseticidas neonicotinoides atua nos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR). Por sua vez, ACh é o principal neurotransmissor dos insetos e que exerce função primordial na plasticidade neural e conseqüentemente para o aprendizado da função olfativa e mecanosensorial pelas abelhas (CHAPMAN, 2013; NAUEN et al., 2001; STENERSEN, 2004). Portanto, a alteração na percepção dos insetos expostos a clotianidina é resultado da perda da capacidade cognitiva do inseto, por conseqüência a dificuldade em analisar e interpretar os estímulos.

Os resultados obtidos indicaram que a clotianidina foi prejudicial à A.

*mellifera*, divergindo das informações de Hassani et al. (2008) que ao avaliarem a PER de abelhas expostas a doses subletais de acetamiprido e tiametoxam, observaram que tiametoxam não foi prejudicial a *A. mellifera*, mas sugeriram susceptibilidade dos insetos ao acetamiprido.

Os resultados observados para a solução de sacarose a 50% do presente trabalho evidenciaram um acréscimo na resposta ao estímulo das abelhas expostas a  $DL_{50/400}$  da clotianidina (0,01 ng/abelha) para 12 e 24 horas (Figura 5 A e B). Semelhantemente aos resultados obtidos por Aliouane et al. (2009), em que acetamiprido também afetou positivamente a resposta dos insetos.

A resposta da PER para abelhas expostas a  $DL_{50/20}$  (0,34 ng/abelha) da clotianidina foi afetada negativamente em praticamente todos os tempos e concentrações de sacarose avaliadas, exceto para concentração de sacarose 50% após 24 e 48 horas da exposição. Em trabalho realizado por Aliouane et al. (2009), também avaliou-se a PER para abelhas expostas via oral a doses subletais de fipronil e tiametoxam. Observou-se que os insetos expostos ao tiametoxam a 1,0 ng/abelha tiveram a capacidade de resposta ao estímulo reduzida, bem como para o fipronil a 0,1 ng/abelha, o qual também afetou negativamente a percepção das abelhas.

Em condições de campo as abelhas necessitam interpretar os estímulos para encontrar os recursos existentes durante o forrageamento. Quando uma abelha pousa sobre uma flor, previamente essas foram submetidas ao processo de condicionamento, onde pistas florais como o odor, cor e forma foram memorizadas e associadas com uma recompensa, como o néctar e pólen (ERBER, 1975a, 1975b; MENZEL; MÜLLER, 1996; PHAM-DELÈGUE et al., 2002). Os experimentos utilizando a PER é uma das maneiras de simular esses estímulos, sendo que no presente estudo foi constatada a redução na capacidade de detectar e analisar os estímulos, uma vez que a clotianidina afetou negativamente a PER das abelhas expostas.

Após 12 horas da aplicação da  $DL_{50/20}$  (0,34 ng/abelha) da clotianidina, a percepção da solução açucarada a 50% pelas abelhas reduziu em 20% (Figura 5). De forma semelhante para as abelhas alimentadas com 0,21 ng/abelha de imidacloprido, houve redução da percepção em 20% da solução de sacarose a 50% em apenas uma hora da oferta da dieta (EIRI; NIEH, 2012).

Assim como a redução da percepção de fontes de alimentos, os inseticidas neonicotínicos podem afetar outras atividades das abelhas. Em estudo realizado por Henry et al. (2012) foi observado que abelhas alimentadas com doses subletais de tiametoxam reduziram a taxa de retorno para colmeia. Pode-se considerar que os produtos fitossanitários são tóxicos para *A. mellifera* alterando a capacidade cognitiva dos insetos, especialmente a habilidade de orientação, a qual é um comportamento fundamental para sua sobrevivência e da colônia (RORTAIS et al., 2005; THOMPSON, 2001).

Além da redução cognitiva, os efeitos da exposição das abelhas aos inseticidas neurotóxicos também podem causar perturbação da programação neural que regula a vida das abelhas, como por exemplo, relógio interno, avaliação e comunicação da distância de fontes de alimento. No nível fisiológico mudanças no comportamento podem resultar na incapacidade das abelhas em alcançar a homeostase metabólica adequada, regular de forma eficiente vias metabólicas em resposta às alterações ambientais ou alterações nas atividades fisiológicas (BELZUNCES; TCHAMITCHIAN; BRUNET, 2012; BOUNIAS; DUJIN; POPESKOVIC, 1985; EVRARD et al., 2010; GORDON; WATKINSON, 1988; HASSANI et al., 2008; MOMMAERTS et al., 2010; RUZZIN et al., 2010; TOMASI; ASHCRAFT; BRITZKE, 2001).

Os inseticidas podem afetar negativamente processos comportamentais das abelhas, incluindo insetos expostos a doses subletais, portanto é fundamental avaliar os efeitos de doses subletais dos inseticidas sobre o comportamento das abelhas (HASSANI et al., 2008).

#### 4 CONCLUSÕES

- A dose letal mediana da clotianidina foi de 6,67 ng/abelha;
- A clotiandina demonstrou ser tóxica para abelhas africanizadas *A. mellifera* afetando negativamente parâmetros biológicos e comportamentais.

## REFERÊNCIAS

ALAUX, C. et al. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 774-782, Mar. 2010.

ALIOUANE, Y. et al. Subchronic exposure of honeybee to sublethal doses of pesticide: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 28, n. 1, p. 113-122, Jan. 2009.

BELZUNCES, L. P.; TCHAMITCHIAN, S.; BRUNET, J. L. Neural effects of insecticides in the honey bee. **Apidologie**, Versailles, v. 43, n. 3, p. 348-370, May 2012.

BITTERMAN, M. E. et al. Classical conditioning of proboscis extension honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Comparative Psychology**, Washington, v. 97, n. 2, p. 107-119, June 1983.

BOILY, M. et al. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 20, n. 8, p. 5603-5614, Aug. 2013.

BOUNIAS, M.; DUJIN, N.; POPESKOVIC, D. S. Sublethal effects of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alkaline phosphatases of honeybees. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 24, n. 2, p. 149-160, Oct. 1985.

BROOKS, G. T. Penetration and distribution of insecticides. In: WILKINSON, C. F. **Insecticide biochemistry and physiology**. New York: Plenum, 1976. chap. 1, p. 3-58.

CASIDA, J. E. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 7, p. 2923-2931, Apr. 2011.

CARRILLO, M. P. et al. Influence of agrochemicals fipronil and imidacloprid on the learning behavior of *Apis mellifera* L. honeybee. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringa, v. 35, n. 4, p. 431-434, Oct./Dec. 2013.

CARVALHO, S. M. et al. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 597-606, out./dez. 2009.

CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. 5<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge University, 2013. 929 p.

CHAUZAT, M. P. et al. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 253-266, Apr. 2006.

CONNER, W. E.; WILKINSON, C. F.; MORSE, R. A. Penetration of insecticides through the foregut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 9, n. 2, p. 131-139, Oct. 1978.

COSTA, E. M. et al. Toxicity of insecticides used in Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. **Apidologie**, Versailles, v. 45, n. 1, p. 34-44, Jan. 2014.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408 p.

CUTLER, G. C.; SCOTT-DUPREE, C. D. Exposure to clothianidin seed-treated canola has no long-term impact on honey bees. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 3, p. 765-77, June 2007.

DANKA, R. G. et al. Foraging population sizes of africanized and european honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Apidologie**, Versailles, v. 17, n. 3, p. 193-202, 1986.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. In: THANY, S. H. **Insect nicotinic acetylcholine receptors**. New York: Springer-Verlag, 2010. chap. 8, p. 85-95.

DECOURTYE, A. et al. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybee under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 57, n. 3, p. 410-419, Mar. 2004.

DECOURTYE, A.; PHAM-DELÈGUE, M. H. The proboscis extension response: assessing the sublethal effects of pesticides on the honey bee. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M. H. (Ed.). **Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals**. London: Taylor & Francis, 2002. chap. 5, p. 67-84.

EIRI, M.; NIEH, J. C. A nicotinic acetylcholine receptor agonist affects honey bee sucrose responsiveness and decreases waggle dancing. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 215, n. 12, p. 2022-2029, June 2012.

ELBERT, A. et al. Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 11, p. 1099-1105, Nov. 2008.

ERBER, J. The dynamics of learning in the honeybee (*Apis mellifica carnica*): I. the time dependence of the choice reaction. **Journal of Comparative Physiology: A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, Berlin, v. 99, n. 3, p. 231-242, Sept. 1975a.

ERBER, J. The dynamics of learning in the honeybee (*Apis mellifica carnica*): II. principles of information processing. **Journal of Comparative Physiology: A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, Berlin, v. 99, n. 3, p. 243-255, Sept. 1975b.

EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. Environmental risk assessment scheme for plant protection products: honeybees. **EPP0 Bulletin**, Paris, v. 33, n. 1, p. 141-145, Apr. 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2338.2003.00619.x/pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

EUROPEAN COMMISSION HEALTH. **Review report for the active substance clothianidin**. Bruxelas, 2005. 26 p. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list\\_clothianidin.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list_clothianidin.pdf)>. Acesso em: 27 out. 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bee for the active substance clothianidin. **EFSA Journal**, Parma, v. 11, n.1, p. 1-58, 2013. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3066.pdf>>. Acesso em 05 nov. 2014.

EVARD, E. et al. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder platichthys flesus. **Biochemistry and Physiology: Part C. Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 152, n. 3, p. 321-331, Sept. 2010.

FISCHER, D. et al. Problem formulation for an assessment of risk to honey bees from applications of plant protection products to agricultural crops. In: FISCHER, D.; MORIARTY, T. **Pesticide risk assessment for pollinators**. Pensacola: Wiley Blackwell, 2014. chap. 6, p. 29-44.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 810-821, Jan. 2009.

GORDON, C. J.; WATKINSON, W. P. Behavioral and autonomic thermoregulation in the rat following chlordimeform administration. **Neurotoxicology and Teratology**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 215-219, May/June 1988.

HALM, M. P. et al. New risk assessment approach for systemic insecticides: the case of honey bees and imidacloprid (Gaucho). **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 40, n. 7, p. 2448-2454, Apr. 2006.

HASSANI, A. K. E. et al. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 54, n. 4, p. 653-661, May 2008.

HENRY, M. et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honeybees. **Science**, Washington, v. 336, n. 6079, p. 348-350, Apr. 2012.

IWASA, T. et al. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, n. 5, p. 371-378, May 2004.

JOHANSEN, C. A.; MAYER, D. F. **Pollinator protection: a bee e pesticide handbook**. Cheshire: Wicwas, 1990. 212 p.

KLEIN, A. M. et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Edinburgh, v. 274, n. 1608, p. 303-313, Feb. 2007.

KRUPKE, C. H. et al. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1-8, Jan. 2012. Disponível em:  
<<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0029268&representation=PDF>>. Acesso em: 03 jan. 2015.

LAURINO, D. et al. Acute oral toxicity of neonicotinoids on different honey bee strains. **Redia: Giornale di Entomologia**, Firenze, v. 93, p. 99-102, 2010.

LAURINO, D. et al. Toxicity of neonicotinoid insecticides on different honey bee genotypes. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 66, n. 1, p. 119-126, 2013.

LAURINO, D. et al. Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 64, n. 1, p. 107-113, 2011.

MAYER, D. F.; LUNDEN, J. D. Toxicity of fungicides and an acaricide to honey bees (Hymenoptera: Apidae) and their effects on bee foraging behavior and pollen viability on blooming apples and pears. **Environmental Entomology**, College Park, v. 15, n. 5, p. 1047-1049, Oct. 1986.

MEDRZYCKI, P. et al. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 52, n. 4, p. 1-60, Apr. 2013.

MENZEL, R.; MÜLLER, U. Learning and memory in honeybees: from behavior to neural substrates. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 19, p. 379-404, Mar. 1996.

MESNAGE, R. et al. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, p. 1-8, Feb. 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/179691/>>. Acesso em: 05 jan. 2015.

MINEAU, P. et al. Using reports of bee mortality in the field to calibrate laboratory-derived pesticide risk indices. **Environmental Entomology**, College Park, v. 37, n. 2, p. 546-554, Apr. 2008.

MOMMAERTS, V. et al. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior. **Ecotoxicology**, London, v. 19, n. 1, p. 207-215, Jan. 2010.

NAUEN, R. et al. Acetylcholine receptors as site for developing neonicotinoid insecticides. In: ISHAYA, I. **Biochemical sites in insecticide action and resistance**. New York: Springer-Verlag, 2001. p. 77-105.

NEGRO, L. et al. Freshwater decapods and pesticides: an unavoidable relation in the modern world. In: STOYTICHEVA, M. **Pesticides in the modern world: risks and benefits**. Rijeka: Intech Europe, 2011. chap. 11, p. 197-226.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, Copenhagen, v. 120, n. 3, p. 321-326, Mar. 2011.

PHAM-DELÈGUE, M. H. P. Behavioural methods to assess the effects of pesticides on honey bees. **Apidologie**, Versailles, v. 33, n. 5, p. 425-432. Sept./Oct. 2002.

POQUET, Y. et al. A pragmatic approach to assess the exposure of the honey bee (*Apis mellifera*) when subjected to pesticide spray. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-12, Nov. 2014. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0113728&representation=PDF>>. Acesso em: 22 jan. 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 12, n. 5, p. 1-22, Jan. 2005. Disponível em: <<http://www.jstatsoft.org/v12/i05/paper>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

RORTAIS, A. et al. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, Versailles, v. 36, n. 1, p. 71-83, Jan./Mar. 2005.

RUTTENER, F. **Biogeography and taxonomy of honeybees**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. 284 p.

RUZZIN, J. et al. Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 118, n. 4, p. 465-471, 2010.

SCHNEIDER, C. W. et al. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. 1-12, Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0030023&representation=PDF>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL. **Sindiveg registra crescimento no setor de defensivos em 2013**. São Paulo, 2014. 2 p. Disponível em: <[http://www.sindiveg.org.br/docs/RELEASE\\_SINDIVEG\\_RESULTADOS\\_2013.pdf](http://www.sindiveg.org.br/docs/RELEASE_SINDIVEG_RESULTADOS_2013.pdf)>. Acesso em: 16 dez. 2014.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Clotianidina**. Brasília, 2014. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 25 maio 2014.

STENERSEN, J. **Chemical pesticide: mode of action and toxicology**. Boca Raton: CRC Press, 2004. 296 p.

STEWART, S. D. et al. Potential exposure of pollinators to neonicotinoid insecticides from the use of insecticide seed treatments in the Mid-Southern United States. **Environmental Science and Technology**, Iowa, v. 48, n. 16, p. 9762-9769, Aug. 2014.

STOKSTAD, E. Field research on bees raises concern about low-dose pesticides. **Science**, Washington, v. 335, n. 6076, p. 1555-1556, Mar. 2012.

STONER, K. A.; EITZER, B. D. Movement of soil-applied imidacloprid and thiamethoxam in nectar and pollen squash (*Curcubita pepo*). **PloS One**, San Francisco, v.7, n. 6, p. 1-5, June 2012. Disponível em:

<<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0039114&representation=PDF>>. Acesso em: 05 nov. 2014.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Discrepancy between acute and chronic toxicity induced by imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 11, p. 2482-2486, Nov. 2001.

THERNEAU, T.; LUMLEY, T. **Survival analysis, including penalised likelihood**: R package version 2.36-5. [S.l.: s.n.], 2011. 104 p. Disponível em: <[http://www.andreberchtold.com/UNIGE/survie/survival\\_help\\_file.pdf](http://www.andreberchtold.com/UNIGE/survie/survival_help_file.pdf)>. Acesso em: 01 set. 2014.

THOMPSON, H. M. Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus sp.*). **Apidologie**, Versailles, v. 32, n. 4, p. 305-321, July/Aug. 2001.

TOMASI, T. E.; ASHCRAFT, J.; BRITZKE, E. Effects of fungicides on thyroid function, metabolism, and thermoregulation in cotton rats. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 8, p. 1709-1715, Aug. 2001.

WU, J. Y.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Sub-lethal effect of pesticides residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PloS One**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 1-11, Feb. 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0014720&representation=PDF>>. Acesso em: 03 jan. 2015.

### **CAPÍTULO 3**

**Abelhas africanizadas *Apis mellifera*  
como biomarcadores da presença da clotianidina**

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar possíveis alterações na atividade das enzimas acetilcolinesterase, três isoformas de carboxilesterase, fosfatase alcalina e glutathione S-transferase em abelhas expostas a doses subletais do inseticida clotianidina. Para realização do bioensaio, adultos e larvas de terceiro e quarto instares de *Apis mellifera* foram expostos à soluções equivalentes a  $DL_{50}$ ,  $DL_{50/400}$  e  $DL_{50/20}$  da clotianidina, para o tratamento controle foi utilizado apenas acetona. Decorridos 24 horas após a exposição dos insetos ao composto, 24 adultos e nove larvas por concentração foram acondicionados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos para cessar as atividades enzimáticas do organismo e a avaliação da atividade das enzimas estudadas. As enzimas acetilcolinesterase e carboxilesterases foram obtidas da cabeça dos adultos, enquanto fosfatase alcalina e glutathione S-Transferase foram obtidas do mesêntero. Para as larvas de terceiro e quarto instares, as enzimas foram obtidas do corpo do inseto como todo. Passados os 30 minutos o tecido do corpo das abelhas a ser avaliado foi macerado em solução tampão conforme a necessidade da enzima, centrifugado a  $13000\text{ g}$  por 20 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi recuperado para avaliação da atividade enzimática por meio da absorbância no leitor de placas. Os resultados indicam que a clotianidina afetou a atividade das enzimas avaliadas, alterando a atividade da acetilcolinesterase em larvas, da mesma forma que modificou a atividade das isoformas da carboxilesterase em larvas e adultos, igualmente as enzimas fosfatase alcalina e glutathione S-transferase nas duas fases de desenvolvimento do inseto. Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o potencial da utilização dessas enzimas como biomarcadores de exposição à xenobióticos, porém, novos estudos devem ser realizados para avaliar o comportamento enzimático em diferentes vias de exposição aos inseticidas.

Palavras-chave: Enzimas. Inseticida. Efeito subletal.

## ABSTRACT

The goal of this study was evaluate the possible changes in the activity of the enzyme acetylcholinesterase, three isoforms of carboxylesterase, alkaline phosphatase and glutathione S-transferase from honeybees exposed to sublethal doses of the insecticide clothianidin. For bioassay, adults and larvae (third and fourth) instar of *Apis mellifera* L., 1758 were done using the doses equivalent to 1/400 and 1/20 of LD<sub>50</sub> of clothianidin. After 24 hours of exposure, 24 adults or nine larvae per treatment were used as samples. The enzymes acetylcholinesterase and carboxylesterases were obtained from the head of the adults while alkaline phosphatase and glutathione S-transferase were obtained from the midgut. For the larvae, enzymes were obtained from the insect's body as whole as. After 30 minutes, the honeybees body tissue to be evaluated were homogenized in a buffered solution as needed enzyme, centrifuged at 13,000 g for 20 minutes at 4 °C. Finished centrifugation, the supernatant was recovered for evaluation of enzymatic activity by the absorbance plate reader. The results show that the affected clothianidin was able to modify the activity of acetylcholinesterase in larvae in the same manner as was modified for the isoforms of carboxylesterase in larvae and adults as well as for alkaline phosphatase and glutathione S-transferase that were affected whatever the insect development phase. Additionally, our results demonstrate the potential of use of these enzymes as biomarkers of exposure to xenobiotics but further studies should be performed to assess the impact of clothianidin on bee enzymes., however further studies should be performed to evaluate the enzymatic behavior in different routes of exposure to insecticides.

Keywords: Enzymes. Insecticide. Sublethal effect.

## 1 INTRODUÇÃO

Biomarcadores são ferramentas utilizadas para revelar informações sobre a saúde ambiental resultantes da ação exercida pelo homem que causa perturbações individuais e/ou populações. Os biomarcadores podem ser alterações observáveis e/ou quantificáveis utilizando como parâmetros modificações comportamentais, fisiológicos, celulares, bioquímicos e/ou moleculares do organismo ao xenobiótico (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012).

Programas de biomonitoramento, em geral, são baseados na adoção de espécies sentinelas, que possam evidenciar alterações do meio. No ambiente terrestre, as abelhas possuem potencial para torna-se um biomarcador de contaminação, podendo constituir indicadores confiáveis, uma vez que ao realizar sua atividade de forrageamento no campo, entram em contato com um grande número de xenobióticos em distâncias de até três quilômetros ao redor da colmeia (AGUILERA et al., 2012; CHAUZAT et al., 2009; LEITA et al., 2004).

Nos últimos anos, observou-se a ocorrência do declínio das populações das abelhas em várias partes pelo mundo, sendo que esse fenômeno pode ser utilizado estrategicamente como forma de monitoramento e diagnóstico da saúde da população apícola, por consequência do ambiente (NGUYEN et al., 2009). Por meio de estudos laboratoriais, pesquisas evidenciaram que a resposta de alguns parâmetros bioquímicos, por exemplo, acetilcolinesterase (AChE), alcalina fosfatase (ALP), carboxilesterase (CaE) e glutathione-S-transferase (GST), caracterizaram a exposição das abelhas a vários compostos, demonstrando que as abelhas possuem potencial para serem utilizadas como ferramentas em programas de biomonitoramento ambiental (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012, 2013; BOUNIAS; DUJIN; POPESKOVIC, 1985; BOUNIAS et al., 1996; CARVALHO et al., 2013).

A enzima AChE é considerada como o maior biomarcador neural dos insetos, demonstrando ser um dos principais alvos de inseticidas como carbamatos e organofosforados, podendo ter sua atividade alterada por outras moléculas, como os piretroides e neonicotinoides, ambos atuantes no sistema nervoso central (BADIOU; MELED; BELZUNCES, 2008; BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012; CARVALHO et al., 2013).

As CaEs pertencem ao grupo das esterases, um grupo amplo e diversificado de enzimas que catalisam as hidrólises das ligações do agrupamento éster da molécula, cujo produto da reação entre um éster carboxílico (RCOOR') com a água forma um álcool (ROH) e carboxilato (RCOO<sup>-</sup>). As CaEs estão presentes em vários tecidos do corpo, como intestino, músculos, cérebro e tecidos do sistema respiratório, sendo amplamente variável a expressão e a atividade no organismo (SATOH; HOSOKAWA, 1998; TERRA et al., 1996; WHEELLOCK; SHAN; OTTEA, 2005). Para CaE, em abelhas africanizadas, Bitondi e Mestriner (1983) observaram a presença de seis isoformas, essas diferiram pela especificidade do substrato, inibidores, castas, desenvolvimento de fases e/ou mobilidade eletroforética. Dessa forma foi avaliado a atividade da CaE, utilizando como substrato  $\alpha$ -NA,  $\beta$ -NA e  $\rho$ -NPA; para três isoformas da CaE correspondentes a cada um dos substratos.

Modificações no funcionamento das CaEs podem comprometer os processos de desintoxicação das abelhas, uma vez que as CaEs auxiliam nesse processo pela clivagem do agrupamento do éster, por exemplo, na inativação de carbamatos, organofosforados e piretroides por meio de sequestro de moléculas (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012; DARY et al., 1990; GUNNING; MOORES; DEVONSHIRE, 1997; STOK et al., 2004; YU; ROBISON; NATION, 1984).

Presente no sistema digestivo, a ALP é uma enzima presente no citosol encontrada nas células epiteliais do intestino médio de larvas de *A. mellifera*

(GREGORC; BOWEN, 1997), assim como nos adultos cuja frequência e atividades são relacionadas ao mesêntero (DELAGE-DARCHEN; CONCONI; AGUILAR, 1982). Essa enzima é responsável pela remoção do grupo fosfato de vários substratos como proteínas, nucleotídeos e alcaloides. As ALP pertencem ao grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de vários fosfomonoésteres em pH alcalino (acima de 8), envolvidas em processos de digestão, transporte de metabólitos e antioxidantes, com função catalítica envolvendo íons metálicos (COLEMAN, 1992).

A GST é uma enzima multifuncional, envolvida na desintoxicação de muitos compostos exógenos e endógenos. A GST atua por meio das conjugações do grupo tiol (RSH) da glutatona aos compostos que possuem centro eletrofílico, tornando solúveis em água e possíveis de eliminação pelo organismo. Acredita-se que GST desempenha funções no transporte intracelular, biossíntese de hormônios e proteção contra o estresse oxidativo (ARMSTRONG, 1997; BOOTH; BOYLAND; SIMS, 1961; ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005). Nos insetos a GST possui seis isoformas principais, sendo que a delta ( $\Delta$ ) e épsilon ( $\epsilon$ ) são específicas dos insetos, com importante interesse devido sua função no metabolismo, conferindo resistência a inseticidas organofosforados e piretroides (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005; FOURNIER et al., 1992; RANSON et al., 2004).

A compreensão dos processos regulatórios, de transporte de metabólitos, de desintoxicação e de estresse oxidativo é de extrema importância para sobrevivência das abelhas, principalmente aquelas submetidas a ambientes onde o uso em larga escala de produtos fitossanitários é uma prática corriqueira. Por serem potenciais organismos bioindicadores da presença de xenobióticos, o presente estudo avaliou as possíveis alterações nas atividades enzimáticas da AChE, ALP, CaEs e GST após intoxicação de larvas e adultos de *A. mellifera* com a clotianidina.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes

O inseticida clotianidina em caráter técnico, assim como o reagente glicerol, cloreto de metil-benzetônio (CMB), sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ), extrato de levedura (EL), D-glicose e D-frutose; ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA); fosfato monobásico de sódio; cloreto de sódio (NaCl); Triton<sup>®</sup> X-100 (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil polietileno glicol); iodeto de acetiltiocolina (AsSCH.I); bicarbonato de sódio;  $\alpha$  e  $\beta$  naftil acetato ( $\alpha$ -NA e  $\beta$ -NA); ácido 5,5'ditio-di (2-nitrobenzóico) (DTNB); p-nitrofenil acetato (p-NPA); fosfato dibásico de sódio; fosfato monobásico de potássio; 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB); L-glutationa reduzida (GSH); acetonitrila; acetona; base Trizma<sup>®</sup> (2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanodiol ou Tris<sup>®</sup>); ácido clorídrico (HCl); cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ); albumina de soro bovino (BSA);  $\rho$ -nitrofenilo fosfato ( $\rho$ -NPP); Fast Garnet GBC (N,N-dimetil anilina-4-fenildiazenil) e dodecilsulfato de sódio (SDS) foram adquiridos na Sigma Aldrich<sup>®</sup> do Brasil.

A geleia real foi obtida diretamente do entreposto Mel Santa Bárbara<sup>®</sup>, Santa Bárbara-MG. O kit Bradford de dosagem de proteína foi adquirido da BioRad<sup>®</sup> Brasil.

### 2.2 Obtenção das abelhas adultas

Para realização dos bioensaios as abelhas africanizadas *A. mellifera* foram obtidas de duas colônias localizadas no apiário do Departamento de Entomologia da UFLA. As abelhas campeiras foram coletadas na melgueira da colmeia equipada com tela excludora, salientando que nos quadros da melgueira

não existia a presença de nenhuma fase de desenvolvimento do inseto (ovo, larva ou pupa), apenas o alimento.

### **2.3 Obtenção de larvas de *A. mellifera***

Para obtenção das larvas, foi utilizada metodologia adaptada de Aupinel et al. (2005, 2007), em que quadros com cera foram dispostos no centro das colmeias para oviposição da rainha. Posteriormente, as larvas com idade de até 24 horas foram transferidas dos quadros com auxílio de um estilete para cúpulas de cera e acondicionadas em placas de cultura celular de 48 células.

#### **2.3.1 Criação *in vitro* de larvas de *A. mellifera***

A criação *in vitro* de larvas de *A. mellifera* foi realizada seguindo metodologia proposta por Aupinel et al. (2005, 2007) e Vandenberg e Shimanuki (1987) com algumas modificações.

Como medida de prevenção, as cúpulas fabricadas por meio de moldes de madeira e cera de abelha, foram esterilizadas previamente por 60 minutos em luz ultravioleta e os demais materiais autoclavados por 15 minutos à 120° C, para eliminar quaisquer contaminantes existentes.

Água destilada foi utilizada para a formulação da dieta para as larvas de *A. mellifera* contendo os açúcares D-glucose, D-frutose, extrato de levedura e geleia real. A concentração e o volume dos componentes da dieta alteraram conforme as exigências nutricionais do inseto durante o desenvolvimento larval (Tabelas 1 e 2).

Para o fornecimento do alimento, o mesmo foi filtrado por meio de membrana Millipore (0,45 µm) e acondicionado nas cúpulas de cera na quantidade adequada com auxílio de pipeta de repetição automática (Tabela 2).

Tabela 1 Composição química e concentração (peso/volume) dos alimentos empregados na criação *in vitro* de larvas de *Apis mellifera*

Ingrediente	Alimento(%)		
	I	II	III
D-glucose	12	15	18
D-frutose	12	15	18
Extrato de levedura	2	3	4
Geleia real	50	50	50

Adaptação da metodologia descrita por Aupinel et al. (2005, 2007)

Tabela 2 Cronograma de alimentação das larvas de *Apis mellifera*

Dia	1 <sup>(1)</sup>	2	3	4	5	6
Alimento	I	I	II	III	III	III
Quantidade de alimento (µL)	15	15	20	30	40	50

<sup>1</sup>data de transferência das larvas L1 com até 24 horas de idade para as cúpulas de cera  
Adaptação da metodologia descrita por Aupinel et al. (2005, 2007)

As cúpulas foram acondicionadas em microplacas de cultura celular com 48 células, após a transferência das larvas de primeiro ínstar (L1), sendo que em cada célula da placa continha algodão esterilizado e embebido em uma solução aquosa de 15% de glicerol e 0,2% de CMB.

Para evitar choque térmico nas larvas, todo material foi mantido dentro de câmaras climáticas à temperatura de  $34 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $80 \pm 5\%$ . A manutenção da umidade foi feita por uma bandeja contendo solução saturada de  $K_2SO_4$  durante a fase de larva.

## **2.4 Exposição de *A. mellifera* a clotianidina para avaliação enzimática**

### **2.4.1 Exposição de adultos**

As abelhas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> por 1,5 minuto. Em seguida foram separados 24 insetos por gaiola de 500 cm<sup>3</sup> que receberam aplicação tópica no tórax de um µL da DL<sub>50</sub>, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50/400</sub> da clotianidina, a qual foi realizada por meio de uma micro seringa acoplada com um dispensador automático. As gaiolas contendo os insetos foram acondicionadas em câmara climática a 28±2 °C, UR de 60±10% e escotofase de 24 horas.

Decorridas 24 horas, os insetos foram mantidos à temperatura de -20 °C para paralisar o metabolismo com o objetivo de avaliar a interferência enzimática do inseticida na abelha. Esse procedimento foi realizado novamente às 48 e 72 horas.

### **2.4.2 Exposição de larvas**

Larvas de *A. mellifera* foram expostas a DL<sub>50</sub>, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50/400</sub> da clotianidina para avaliação da atividade enzimática. As condições laboratoriais foram idênticas àquelas descritas no subitem 2.3.1. Larvas de terceiro e quarto ínstar (L3 e L4) foram expostas por meio da aplicação tópica direta no tegumento empregando uma alíquota de 0,5 µL de uma solução do inseticida dissolvido em acetona por meio de uma microseringa acoplada com um repetidor automático.

Decorridas 24 horas da exposição ao composto, nove larvas (três larvas com três repetições) de cada um dos estádios foram coletadas e acondicionadas à temperatura de -20 °C para redução da atividade com objetivo de avaliar a

influência enzimática do inseticida nas larvas de abelha. O procedimento foi repetido às 48 horas e 72 horas após aplicação do inseticida.

## **2.5 Avaliação enzimática de abelhas expostas a clotianidina**

### **2.5.1 Extração em cabeça e em mesêntero de adultos de *A. mellifera***

#### **2.5.1.1 Cabeças**

Após 30 minutos expostas à -20 °C, as abelhas foram consideradas mortas. Com auxílio de um bisturi as cabeças foram seccionadas do restante do corpo do inseto, acondicionadas em microtubos de centrifugação de 1,5 mL previamente pesados, com seis repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída por quatro cabeças.

Posteriormente, adicionou-se a solução de extração LST na razão de 1/10 do peso médio das cabeças, com solução tampão constituída de fosfato de sódio 40 mM a pH 7,4; 10 mM de NaCl e 1% de Triton<sup>®</sup> X100. As cabeças foram maceradas utilizando micropistilo por um período de 30 segundos e as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 20 minutos. Todos os procedimentos de extração foram realizados a 4 °C. No final da centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e armazenado em -20 °C até a realização das análises.

#### **2.5.1.2 Mesêntero**

Após a decapitação das abelhas, também foram retirados o intestino médio das abelhas puxando o ferrão com auxílio de uma pinça e acondicionando-os em microtubos de 1,5 mL previamente tarados. Para a

extração das enzimas, utilizou-se uma solução de extração LS constituída de tampão fosfato de sódio 40 mM a pH 7,4 e 10 mM de NaCl, sendo adicionada em cada microtudo na razão de 1/10 do peso dos intestinos médio, contendo quatro intestinos por microtubo e seis repetições por tratamento avaliado.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por meio de um micropistilo e posteriormente centrifugadas a 13.000 g durante 20 minutos. Todos os procedimentos de extração foram realizados a 4 °C. No final da centrifugação, o sobrenadante foi recuperado e armazenado em -20 °C até a realização das análises.

### **2.5.2 Extração em larvas de *A. mellifera***

A extração enzimática foi realizada utilizando larvas de terceiro e quarto ínstars como um todo, as quais foram acondicionadas em tubos previamente tarados e a solução de extração a 1/3 do peso das amostras, sendo ela constituída de fosfato de sódio 40 mM a pH 7,4; 10 mM de NaCl e 0,5% de Triton<sup>®</sup> X100. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com auxílio de um micropistilo, centrifugadas a 13.000 g por 20 minutos e o sobrenadante recuperado e armazenado à -20 °C. Todas as etapas de extração foram executadas à 4 °C.

### **2.5.3 Quantificação do teor de proteína**

Os teores de proteína das amostras de tecidos das abelhas (adulto e larvas) foram analisados segundo método de Bradford (1976) utilizando o kit de ensaios de proteína fornecido pela Bio-Rad<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratórios Ltda., Brasil) e BSA como padrão. Os teores de proteína foram utilizados para determinação da atividade específica. A atividade no tecido foi padronizada

utilizando-se o peso das amostras no momento do preparo dos extratos enzimáticos.

#### **2.5.4 Medições enzimáticas**

As análises enzimáticas foram realizadas usando o leitor de microplacas BioTek® PowerWave HT com auxílio do software de análise de dados Gen5®. A temperatura mantida durante as leituras foi de  $25 \pm 0,5$  °C. O volume final da reação foi de 200  $\mu$ L, sendo cada amostra analisada em triplicata.

O teor de proteína foi utilizado para determinação da atividade específica. A atividade no tecido foi padronizada utilizando-se o peso das amostras no momento do preparo dos extratos enzimáticos.

##### **2.5.4.1 Acetilcolinesterase (AChE)**

A atividade da AChE (EC 3.1.1.7) foi determinada de acordo como a metodologia desenvolvida por Ellman et al. (1961) e adaptada por Belzunces, Lenoir-Rousseaux e Bounias (1988) e Badiou, Meled e Belzunces (2008), sendo a reação avaliada a 412 nm. Em cada célula adicionou-se 5  $\mu$ L de um dos extrato enzimáticos (cabeça ou larva) com 195  $\mu$ L de solução tampão fosfato de sódio a 100 mM pH 7,0; 1,5 mM DTNB e 0,3 mM de AsSchI.

##### **2.5.4.2 Carboxilesterase (CaE)**

Três isoformas de carboxilesterases (EC 3.1.1.1) foram avaliadas, a quais são definidas em função da afinidade aos substratos  $\alpha$ -NA,  $\beta$ -NA e  $\rho$ -NPA denominadas de CaE-1, CaE-2 e CaE-3, respectivamente (BITONDI; MESTRINER, 1983; GOMORI, 1953; VAN ASPEREN, 1962).

Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  do extrato de cabeça da abelha ou larvas foi adicionada em cada compartimento da microplaca e, em seguida, 195  $\mu\text{L}$  do meio reacional contendo solução tampão de fosfato de sódio a 100 mM e pH 7,0; 0,4 mM do respectivo substrato  $\alpha$ -NA,  $\beta$ -NA e  $\rho$ -NPA diluído em etanol e água destilada.

Para as isoformas CaE-1 e CaE-2, decorrido três minutos do início da reação, a mesma foi interrompida utilizando uma solução de 1,5% de SDS com 0,4 mg/mL de Fast Garnet GBC, com leitura de 568 nm para CaE-1 e 515 nm para CaE-2. No caso da CaE-3, a reação foi monitorada a 410 nm em modo cinético sem a necessidade de interromper a reação (BADIOU-BENETEAU et al., 2012).

#### **2.5.4.3 Fosfatase alcalina (ALP)**

A atividades da fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1) foi avaliada seguindo o método proposto por Bessey, Lowry e Brock (1946) adotado por Bounias et al. (1996) e Badiou-Beneteau et al. (2012).

Para realização do bioensaio com ALP em cada célula da microplaca continha 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático (intestino dos adultos ou o corpo das larvas de terceiro ou quarto ínstar), 50  $\mu\text{L}$  da solução tampão contendo Tris<sup>®</sup>HCl, 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{Mg}_2\text{Cl}_2$ , 20  $\mu\text{L}$  de  $\rho$ -NPP e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada, totalizando 200  $\mu\text{L}$  de volume final. As leituras de absorbância foram realizadas a 410 nm no espectrofotômetro. Da mesma forma o procedimento foi realizado para avaliar as larvas de *A. mellifera*.

#### **2.5.4.4 Glutathione S-transferase (GST)**

A reação da glutathione S-transferase (GST) (EC 2.5.1.18) foi avaliada utilizando metodologia descrita por Habig, Pabst e Jakoby (1974) e adaptada por Badiou-Beneteau et al. (2012), com leitura a 340 nm. O meio reacional adicionado em cada célula da microplaca foi constituído de 190 µL de solução tampão fosfato de sódio/fosfato de potássio 100 mM e pH 7,4; 1 mM de EDTA; 2,5 mM de GSH e 1 mM de CDNB (diluído em etanol e água, 1:1). O extrato enzimático (10 µL) utilizado para a leitura enzimática foi obtido do intestino médio para dos adultos e do corpo de larvas de terceiro e quarto ínstares.

#### **2.6 Análise dos dados**

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, sendo que todas as análises foram realizadas pelo software R<sup>®</sup>. Os bioensaios com as enzimas, os dados foram submetidos à análise de variância, avaliados pela rotina GLM e as médias foram comparadas por análise de contraste ( $p \leq 0,05$ ), formando grupos com comportamento similar (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Acetilcolinesterase (AChE)

Após 24 horas da exposição dos adultos a clotianidina não foram observados alterações na atividade da AChE no tecido com média de 24,3  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido. Decorridas 48 horas, a atividade média da AChE foi de 22,1  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, enquanto que após 72 horas da exposição da clotianidina a atividade média da AChE foi de 28,6  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido (Figura 1.I.A).

Para a atividade específica, nas abelhas campeiras expostas não houve alterações na atividade específica da AChE a qual é influenciada pela quantidade de proteína, em que observou-se atividade específica média após de 24 horas da exposição de 103,9  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína. Igualmente, não observou-se modificações na atividade específica da AChE de abelhas decorridos 48 e 72 horas após aplicação da clotianidina, com média de 97,9 e 123,9  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína, respectivamente (Figura 1.II.A).

Em larvas de terceiro ínstar (L3) de *A. mellifera* a atividade da AChE no tecido foi afetada pela clotianidina. Decorrido 24 horas da aplicação do inseticida, a atividade no tecido de insetos expostos a  $\text{DL}_{50/400}$  a média foi de 13,6  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, enquanto para os demais tratamentos a média foi de 8,5  $\mu\text{mol/mim/g}$ . Com 48 horas da aplicação dos compostos constatou-se aumento da atividade da AChE para todas as doses administradas de clotianidina com média superior a 14,6  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, enquanto o tratamento controle foi de 10,7  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido. Para 72 horas após contaminação das abelhas ocorreu redução da atividade no tecido para  $\text{DL}_{50/20}$  e  $\text{DL}_{50}$  com média de 10  $\mu\text{mol/mim/g}$ , enquanto que para o tratamento controle e  $\text{DL}_{50/400}$  foi de 13  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido (Figura 1.I.B).

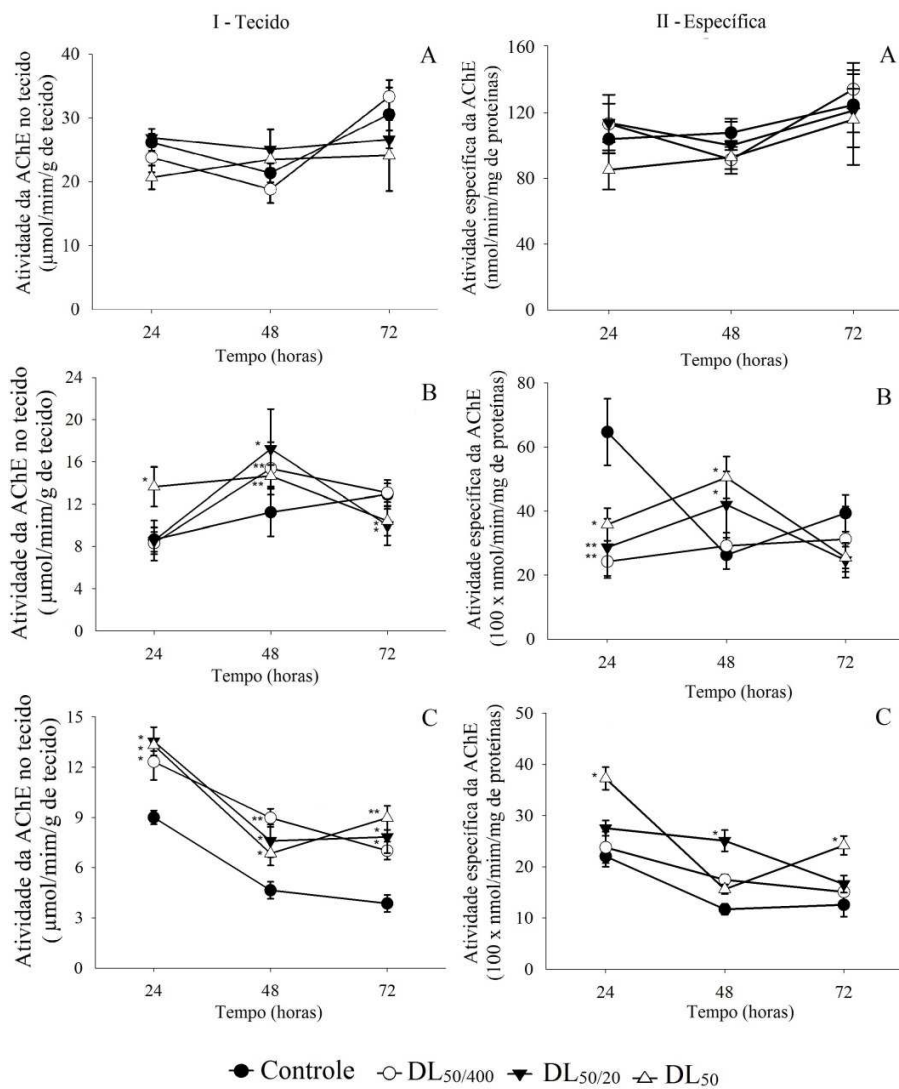


Figura 1 Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em *Apis mellifera* expostas à aplicação tópica da DL<sub>50/400</sub> (0,01 ng/abelha), DL<sub>50/20</sub> (0,34 ng/abelha) e DL<sub>50</sub> (6,67 ng/abelha) de clotianidina. Os resultados são expressos como a média da atividade de tecido e a específica. Erro padrão. (A) = adultos, (B) = larvas de terceiro instar e (C) = larvas de quarto instar. \* Médias não diferem entre si pelo teste de contraste entre médias ( $p \leq 0,05$ )

Identificou-se redução da atividade específica da AChE em L3 para todas as doses da clotianidina após 24 horas da aplicação, com média na atividade específica de 29,5 nmol/mim/mg, enquanto o tratamento controle foi de 64,7 nmol/mim/mg. Entretanto, depois de 48 horas da exposição, para as DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub> notou-se a elevação na atividade da enzima específica com média de 46,2 nmol/mim/mg, enquanto o tratamento controle e a DL<sub>50/400</sub> foi de 27,7 nmol/mim/mg. Para 72 horas não ocorreu diferença na atividade específica da AChE entre os tratamentos, com média de 30,2 nmol/mim/mg (Figura 1.II.B).

A atividade enzimática da AChE no tecido de larvas de quarto ínstar (L4) expostas a clotiandina foram elevadas independentemente do tempo de avaliação, em que após 24 horas a média da atividade do controle foi de 8,9 µmol/mim/g enquanto que os demais tratamentos foi de 13 µmol/mim/g. Para 48 horas a atividade média do controle foi de 4,6 µmol/mim/g e para os demais tratamentos foi de 7,7 µmol/mim/g. Decorridos 72 horas a atividade do tecido do controle foi de 3,8 µmol/mim/g, enquanto os demais tratamentos foi superior a 7 µmol/mim/g de tecido (Figura 1.I.C).

Da mesma maneira que aconteceu na atividade do tecido, observou-se acréscimo na atividade específica de L4 exposta a clotianidina, em que após 24 horas a média 24,4 nmol/mim/mg de proteína, enquanto para a DL<sub>50</sub> foi de 37,2 nmol/mim/mg. Após 48 horas a atividade específica para o tratamento controle foi de 11,7 nmol/mim/mg, enquanto para DL<sub>50/20</sub> a média 25 nmol/mim/mg. Para DL<sub>50</sub> da clotianidina transcorrido 72 horas a média da atividade específica foi de 24,1 nmol/mim/mg, enquanto o tratamento controle foi de 12,6 nmol/mim/mg (Figura 1.II.C).

Com relação às diferenças entre as atividades da AChE extraídas das larvas e adultos, pode ser interpretada e justificada por diferentes maneiras, mas principalmente pela correlação direta com a forma de obtenção da enzima e também o teor da AChE no tecido estudado. Por exemplo, no processo de

extração da AChE em adultos utilizou-se somente a cabeça, enquanto que para as larvas foi avaliado o extrato de todo o corpo. Nessa situação, observa-se que na cabeça do adulto grande parte é preenchida pelo cérebro, que apresenta maior teor da AChE, enquanto que a larva de *A. mellifera* apresenta cérebro rudimentar e o corpo é constituído praticamente pelo corpo gorduroso e o sistema digestório (CRUZ-LANDIM, 2009).

Outro fator que possivelmente está relacionado à diferença na atividade enzimática da AChE entre larvas e adultos, por exemplo a presença dos apêndices locomotores e sensoriais nas abelhas adultas, os quais são fundamentais para suas atividades, implicando no aumento da AChE por atuarem no principal neurotransmissor dos impulsos nervosos dos insetos. Para as larvas de himenópteros a atividade da AChE é reduzida, os quais são àpodas além de não possuírem antenas e olhos compostos, reduzindo a atividade da AChE. Nessa fase há limitação da percepção dos estímulos, uma vez que todo o período larval ocorre dentro da colmeia e no interior da célula, sendo que o único objetivo da abelha nesse momento é o crescimento corporal e o seu desenvolvimento, que ao término desse período o inseto aumenta 1500 vezes o seu tamanho inicial (CRUZ-LANDIM, 2009).

Os resultados apresentados na presente pesquisa, evidenciaram que a clotianidina não afetou a atividade AChE no tecido em adultos (Figura 1.I.A), diferentemente do estudo realizado por Boily et al. (2013), os quais constataram que a atividade da AChE em cabeças de abelhas foi afetada após exposição ao imidacloprido a 0,08 e 0,24 ng/abelha, assim como para as doses 0,12 e 0,24 ng/abelha de clotianidina em adultos de *A. mellifera*.

Para larvas de terceiro ínstar, verificou-se que após as primeiras 24 horas da exposição a  $DL_{50}$  da clotianidina, a atividade específica da AChE foi influenciada negativamente (Figura 1.II.B), aproximando-se das observações realizadas por Badawy, Nasr e Rabea (2014) os quais constataram redução da

atividade específica da AChE para abelhas expostas ao acetamiprido, dinotefuran, pimezina e piridilil.

A atividade no tecido e específica da AChE para adultos não afetada, assemelhando-se aqueles de Badiou-Béneteau et al. (2012) os quais verificaram que a atividade no tecido e específica da AChE das abelhas não foram modificadas após exposição ao tiametoxam.

A alteração na atividade da AChE, resultantes da exposição das abelhas aos neonicotinoides prejudicam o desempenho da aprendizagem e funções mnemônicas dos insetos (BELZUNCES; TCHAMITCHIAN; BRUNET, 2012; BENZIDANE et al., 2010). Contudo, no presente trabalho não se observou modificações na atividade da AChE. Porém outros estudos sugerem que a clotianidina é tóxica para abelhas mesmo em dose subletal encontrada no em fontes de alimento com o néctar e o pólen. Em consequência da intoxicação aos inseticidas, pode ocorrer alterações na atividade AChE, o que resulta na perda de capacidade e/ou funções neurais. Por exemplo, a capacidade cognitiva é fundamental para classificar estímulos de acordo com características comuns, tratando-os de forma semelhantes ou equivalentes e respondendo assim a eles da mesma maneira (WU et al., 2013; ZENTALL et al., 2008).

Por fim, a atuação da AChE ocorre na sinapse colinérgica pela hidrólise da acetilcolina com a formação de colina e acetato, que posteriormente são reabsorvidos pelas células pré-sinápticas e reutilizados na síntese de novas moléculas de acetilcolina. O processo de hidrólise da acetilcolina em colina e acetato interrompe a transmissão dos impulsos nervosos cessando o estímulo (O'BRIEN, 1976). Uma vez comprometido o equilíbrio do sistema, ocorrerá alterações nos impulsos nervosos, acarretando modificações na atividade enzimática e na sanidade do organismo.

### 3.2 Carboxilesterase (CaE)

Verificou-se redução na atividade da CaE-1 no tecido após 24 horas a exposição da DL<sub>50/400</sub> e DL<sub>50/20</sub> da clotianidina, com média de atividade de 25,5  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, enquanto que para o tratamento controle foi de 33,1  $\mu\text{mol/mim/g}$ . Transcorridas 48 horas da exposição, a atividade tecidual foi elevada pela DL<sub>50</sub> da clotianidina, com média de 43,8  $\mu\text{mol/mim/g}$ , enquanto o tratamento controle foi de 31,1  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido. Depois de 72 horas da exposição da clotianidina todas as doses avaliadas da clotianidina reduziram à atividade no tecido, com média inferior a 40  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, enquanto o tratamento controle foi de 47,5  $\mu\text{mol/mim/g}$  (Figura 2.I.A).

Ao avaliar a atividade específica da CaE-1, constatou-se aumento na atividade específica em insetos expostos a DL<sub>50/400</sub> da clotianidina decorridas 24 e 48 horas, com médias de 145,8 e 179,6  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína, enquanto o controle foi de 129,7 e 155,9  $\text{nmol/mim/mg}$ , respectivamente. Porém, passadas 72 horas, verificou-se na DL<sub>50/20</sub> redução da atividade com média de 120  $\text{nmol/mim/mg}$ , contra 149  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína para o controle (Figura 2.II.A).

Não foram observadas alterações na atividade no tecido da CaE-1 em L3 expostas a clotianidina, sendo para 24 horas a média na atividade de 16  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido. Enquanto que após 48 horas a média na atividade foi de 10,9  $\mu\text{mol/mim/g}$ . Transcorridas 72 horas da exposição das L3 a clotianidina verificou-se que a atividade média foi de 10,5  $\mu\text{mol/mim/g}$  (Figura 2.I.B).

Transcorridos 24 horas da exposição com clotianidina a atividade específica da CaE-1 para L3 foi reduzida para todas as doses avaliadas, sendo a média inferior a 520  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína, enquanto o tratamento controle foi de 624  $\text{nmol/mim/mg}$ . Passadas 48 horas após exposição, a DL<sub>50/400</sub> reduziu a atividade da enzima, com média de 202  $\text{nmol/mim/mg}$ , enquanto para DL<sub>50</sub>

aconteceu o oposto, com média de 412 nmol/mim/mg, no mesmo período a atividade do controle foi de 271 nmol/mim/mg. Após 72 horas da aplicação da clotianidina, observou-se elevação da atividade específica da AChE, com média de 290 nmol/mim/mg de proteína, contra 189 nmol/mim/mg do controle (Figura 2.II.B).

Para L4 não houve diferenças significativas para atividade no tecido, após 24 horas da exposição, sendo a média de 11  $\mu$ mol/mim/g. Decorridos 48 horas a aplicação da clotianidina, a média na atividade foi de 6,4  $\mu$ mol/mim/g, enquanto que transcorridas 72 horas da exposição, a média na atividade no tecido foi de 3,6  $\mu$ mol/mim/g (Figura 2.I.C).

Observou-se alterações na atividade específica da CaE-1 das L4 expostas a clotianidina, em que a a  $DL_{50/20}$  aumentou a atividade da CaE-1, enquanto a  $DL_{50}$  reduziu sua atividade, com médias de 325,7 e 193,5 nmol/mim/mg de proteína, respectivamente, enquanto o tratamento controle foi de 223,6 nmol/mim/mg. Passadas 48 horas da exposição da  $DL_{50/400}$  da clotianidina ocorreu acréscimo na atividade específica da CaE-1, enquanto a  $DL_{50/20}$  reduziu a atividade dessa enzima, com médias de 198,9 e 116 nmol/mim/mg, contra 155,2 nmol/mim/mg do tratamento controle. Após 72 horas, a atividade enzimática dos insetos expostos a clotianidina ficou abaixo dos 85 nmol/mim/mg, enquanto registou-se atividade de 125,7 nmol/mim/mg para o tratamento controle (Figura 2.II.C).

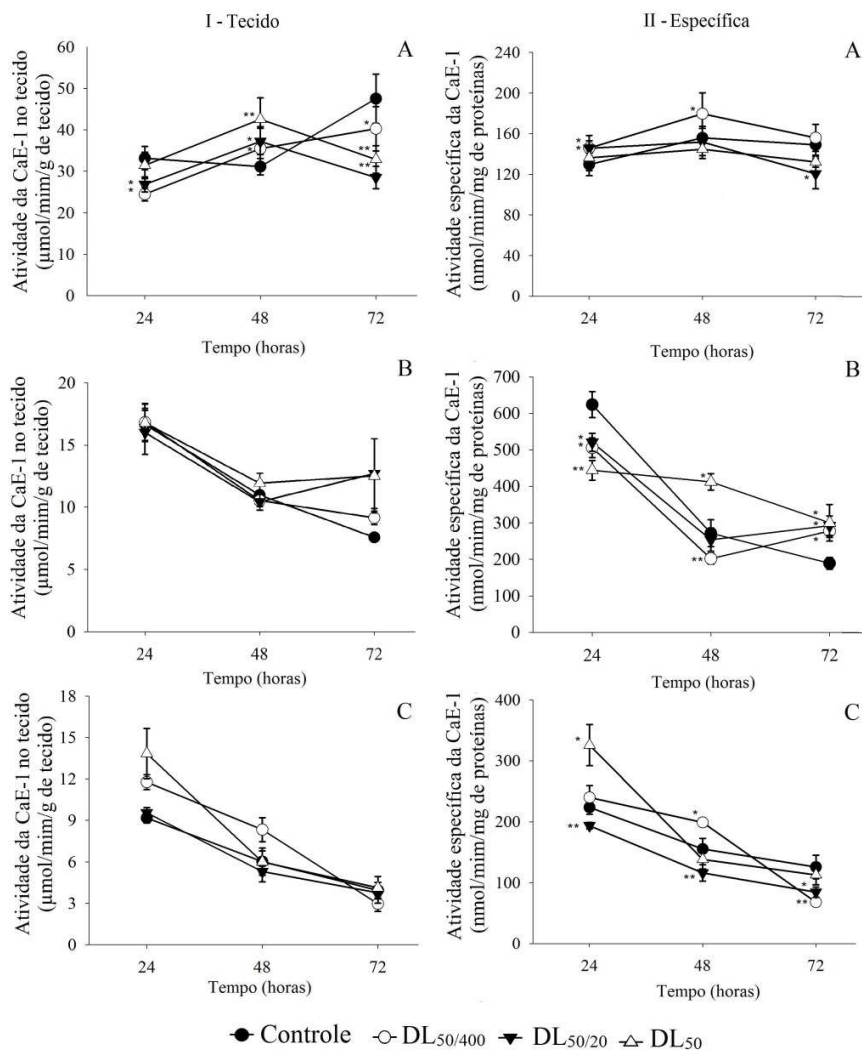


Figura 2 Atividade da carboxilesterase (CaE-1) em *Apis mellifera* expostas à aplicação tópica da DL<sub>50/400</sub> (0,01 ng/abelha), DL<sub>50/20</sub> (0,34 ng/abelha) e DL<sub>50</sub> (6,67 ng/abelha) de clotianidina. Os resultados são expressos como a média da atividade de tecido e a específica. Erro padrão. (A) = adultos, (B) = larvas de terceiro instar e (C) = larvas de quarto instar. \* Médias não diferem entre si pelo teste de contraste entre médias ( $p \leq 0,05$ )

Constatou-se que a atividade da CaE-2 no tecido das abelhas campeiras praticamente não foi alterada pela exposição dos insetos a clotianidina, exceto para DL<sub>50/400</sub>, após 24 e 48 horas, com médias de 51,7 e 62,5  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, enquanto os demais tratamentos as médias foram 60,3 e 53,2  $\mu\text{mol/mim/g}$ , respectivamente. Para 72 horas após a aplicação da clotianidina não ocorreram alterações significativas na atividade da CaE-2 no tecido dos adultos expostos, com média de atividade de 56,2  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido (Figura 3.I.A).

Terminadas as primeiras 24 horas da exposição, praticamente não houve alterações na atividade específica da CaE-2 dos adultos, exceto para DL<sub>50</sub> com redução de 9% em sua atividade, sendo que a média do tratamento controle foi de 240,9 nmol/mim/mg de proteína. Porém, para os tempos de 48 e 72 horas as DL<sub>50/400</sub> e DL<sub>50</sub> afetaram a atividade da CaE-2, com médias de 296,8 e 208,1 nmol/mim/mg, e 206,9 e 275,7 nmol/mim/mg, enquanto o tratamento controle foi de 247,1 e 230,6 nmol/mim/mg de proteína, respectivamente (Figura 3.II.A).

Em L3 a atividade do tecido da CaE-2 foi alterada 24 após a exposição da DL<sub>50/400</sub> da clotianidina, com média de 67,7  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, contra 59,6  $\mu\text{mol/mim/g}$  observado no tratamento controle. Para 48 horas após intoxicação não houve alterações na atividade do tecido, com média de 58,4  $\mu\text{mol/mim/g}$ . Decorridas 72 horas após da exposição ao inseticida, observou-se acréscimo na atividade da CaE-2 devido a presença da clotianidina, com média superior a 55  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, enquanto o tratamento controle foi de 44  $\mu\text{mol/mim/g}$  (Figura 3.I.B).

Transcorridos 24 horas da aplicação da clotianidina nas L3, não houve alterações significativas na atividade específica da CaE-2, com média de 248 nmol/mim/mg. Após 48 horas, a DL<sub>50/400</sub> reduziu atividade da enzima, com média de 197,5 nmol/mim/mg de proteína, contra 246,4 nmol/mim/mg, enquanto a DL<sub>50</sub> aumentou a atividade da CaE-2 com média de 277,6

nmol/mim/mg. Decorridas 72 horas da aplicação da clotianidina, a atividade média do controle foi de 240,3 nmol/mim/mg, enquanto os demais tratamentos aumentaram no mínimo 12% a atividade da CaE-2, com médias superiores a 269,5 nmol/mim/mg (Figura 3.II.B).

Não foi observado alterações na atividade no tecido da CaE-2 em L4 expostas a clotianidina 24 horas após a aplicação, com média de 54,3  $\mu$ mol/mim/g. Da mesma forma, não foram observados alterações na atividade da CaE-2 em L4 48 horas após a exposição, com média na atividade de 57,8  $\mu$ mol/mim/g de tecido. Porém, para 72 horas, ocorreu alteração da atividade no tecido, quando L4 foram expostas a DL<sub>50/400</sub> e DL<sub>50/20</sub> clotianidina, com média de 48,6  $\mu$ mol/mim/g, enquanto que o tratamento controle observou-se média de 58,5  $\mu$ mol/mim/g (Figura 3.I.C).

Expostas a DL<sub>50/20</sub> de clotianidina, L4 tiveram atividade específica da CaE-2 reduzida 24 horas após a aplicação, registrando 178 nmol/mim/mg de proteína, enquanto que para controle observou-se 237 nmol/mim/mg. Decorridas 48 horas as DL<sub>50/400</sub>, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub> aumentaram a atividade específica da CaE-2 em 24%, com média de 239,1 nmol/mim/mg, enquanto o controle foi de 192,7 nmol/mim/mg. Após as 72 horas, observou-se a atividade de 314 nmol/mim/mg de proteína da CaE-2 para L4 expostas com DL<sub>50</sub> de clotianidina, o que significou aumento de 25% da atividade específica da CaE-2 (Figura 3.II.C).

A atividade da CaE-3 no tecido foi reduzida para adultos expostos DL<sub>50/400</sub> e DL<sub>50</sub> após 24 horas, enquanto DL<sub>50/20</sub> afetou negativamente após 48 horas. Decorridas 72 horas observou-se redução da atividade da CaE-3 para os adultos expostos a clotianidina, em que atividade enzimática para DL<sub>50</sub> foi de 4,4  $\mu$ mol/mim/g de tecido e para o controle de 28,2  $\mu$ mol/mim/g (Figura 4.I.A).

Transcorridas 24 horas, a atividade específica da CaE-3, ocorreu redução da atividade, em que o controle foi registrado 125,4 nmol/min/mg de proteína, enquanto para DL<sub>50/400</sub>, DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub> foram registradas atividade de

112,9; 117,6 e 100,1 nmol/min/mg, respectivamente. Passadas 48 horas a clotianidina alterou negativamente a atividade específica da CaE-3 verificando-se atividade de 81,5 e 91,2 nmol/mim/mg de proteína para DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub>, respectivamente. Assim, como para 24 e 48 horas a atividade específica da CaE-3 foi reduzida pela exposição a DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub> da clotianidina, com médias de 65,7 e 19,6 nmol/min/mg de proteína, contra 113,3 nmol/min/mg do tratamento controle (Figura 4.II.A).

Para 24 e 48 horas após a exposição a DL<sub>50/20</sub> da clotianidina, não houve diferença significativa na atividade da CaE-3 no tecido de L3, com média de 13,2 e 9,1  $\mu$ mol/mim/g de tecido, respectivamente. Após 72 horas, constatou-se elevação de 70% da atividade enzimática dos insetos submetidos à DL<sub>50/400</sub> e DL<sub>50/20</sub> da clotianidina (Figura 4.I.B).

Registrou-se redução da atividade específica da CaE-3 para todas as doses da clotianidina após 24 horas aplicação, observou-se atividade de 682 nmol/mim/mg de proteína para o controle, enquanto para DL<sub>50/20</sub> e DL<sub>50</sub> da clotianidina foram 368 e 341 nmol/mim/mg de proteína, respectivamente. Situação semelhante foi observada para 48 horas, com média na atividade da CaE-3 de 155 nmol/mim/mg para DL<sub>50/400</sub> e DL<sub>50/20</sub>. Contudo, para DL<sub>50</sub> verificou-se elevação da atividade enzimática, registrando atividade de 339 nmol/mim/mg de proteína, contra 259 nmol/mim/mg para o controle. Passadas 72 horas verificou-se que as doses subletais aumentaram a atividade enzimática específica da CaE-3, com médias de 284,6 e 226,6 nmol/mim/mg para DL<sub>50/400</sub> e DL<sub>50/20</sub>, enquanto a atividade específica da CaE-3 para o controle foi de 140 nmol/mim/mg (Figura 4.II.B).

Após 24 e 48 horas da exposição a clotianidina, não foram registradas diferenças significativas na atividade da CaE-3 no tecido de L4, com média na atividade de 6,3 e 4,4  $\mu$ mol/mim/g de tecido, respectivamente. De forma semelhante, os insetos avaliados após 72 horas da exposição da clotianidina não

afetaram a atividade da CaE-3 em L4, contudo, com resultados observados para as doses avaliadas de clotianidina foram abaixo de 1  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido (Figura 4.I.C).

A atividade específica da CaE-3 em L4 aumentou após 24 horas da aplicação da  $DL_{50}$  da clotianidina, com média de 171,2  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína, enquanto o controle foi 127,7  $\text{nmol/mim/mg}$ . Para 48 horas após, ocorreu aumento da atividade da CaE-3 para  $DL_{50/400}$ , com média de 156,5  $\text{nmol/mim/mg}$ , enquanto os demais tratamentos com clotianidina reduziu a atividade, com média de atividade de 83  $\text{nmol/mim/mg}$ , sendo que no tratamento controle a atividade específica foi de 97,7  $\text{nmol/mim/mg}$ . Após 72 horas, a atividade específica da CaE-3 desse foi de 88,4  $\text{nmol/mim/mg}$ , enquanto os demais tratamentos com a clotianidina reduziram a atividade específica, com média inferior a 22  $\text{nmol/mim/mg}$  (Figura 4.II.C).

A redução das atividades foram significativas para as enzimas CaE-1 e CaE-3 em L4 após 72 horas da exposição da clotianidina, como pode-se observar a menor atividade dessas enzimas (Figuras 2.C e 4.C). Esse comportamento possivelmente foi ocasionado pelo fato dos insetos estarem na fase de pré-pupa, momento onde há outro objetivo fisiológico das larvas, como por exemplo produzir a seda para construção do casulo e conseqüentemente iniciar a fase de pupa. Esse período que antecede a pupa todos os processos metabólicos são reduzidos poupando energia para a metamorfose, quando o inseto desenvolve todas as características de um adulto (CRUZ-LANDIM, 2009; HENDRISKMA; HÄRTEL; STEFFAN-DEWENTER, 2011).

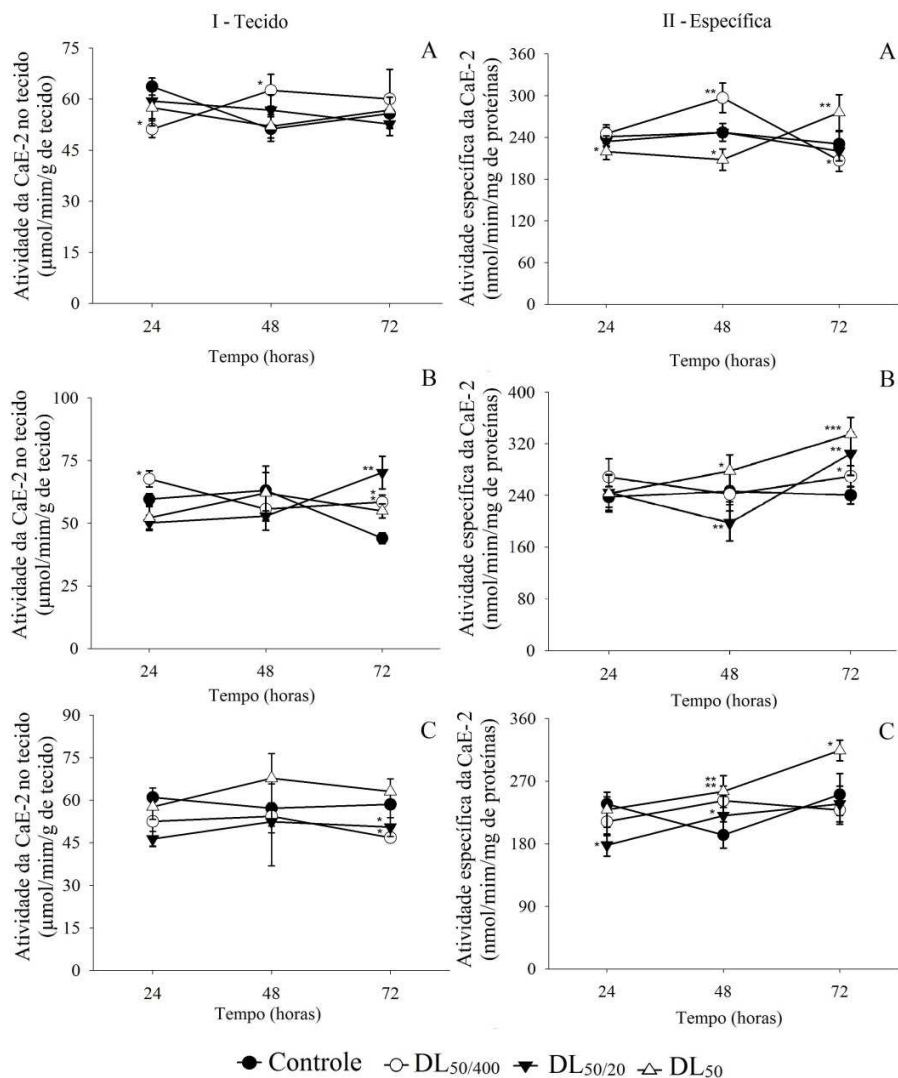


Figura 3 Atividade da carboxilesterase (CaE-2) em *Apis mellifera* expostas à aplicação tópica da DL<sub>50/400</sub> (0,01 ng/abelha), DL<sub>50/20</sub> (0,34 ng/abelha) e DL<sub>50</sub> (6,67 ng/abelha) de clotianidina. Os resultados são expressos como a média da atividade de tecido e a específica. Erro padrão. (A) = adultos, (B) = larvas de terceiro instar e (C) = larvas de quarto instar. \* Médias não diferem entre si pelo teste de contraste entre médias ( $p \leq 0,05$ )

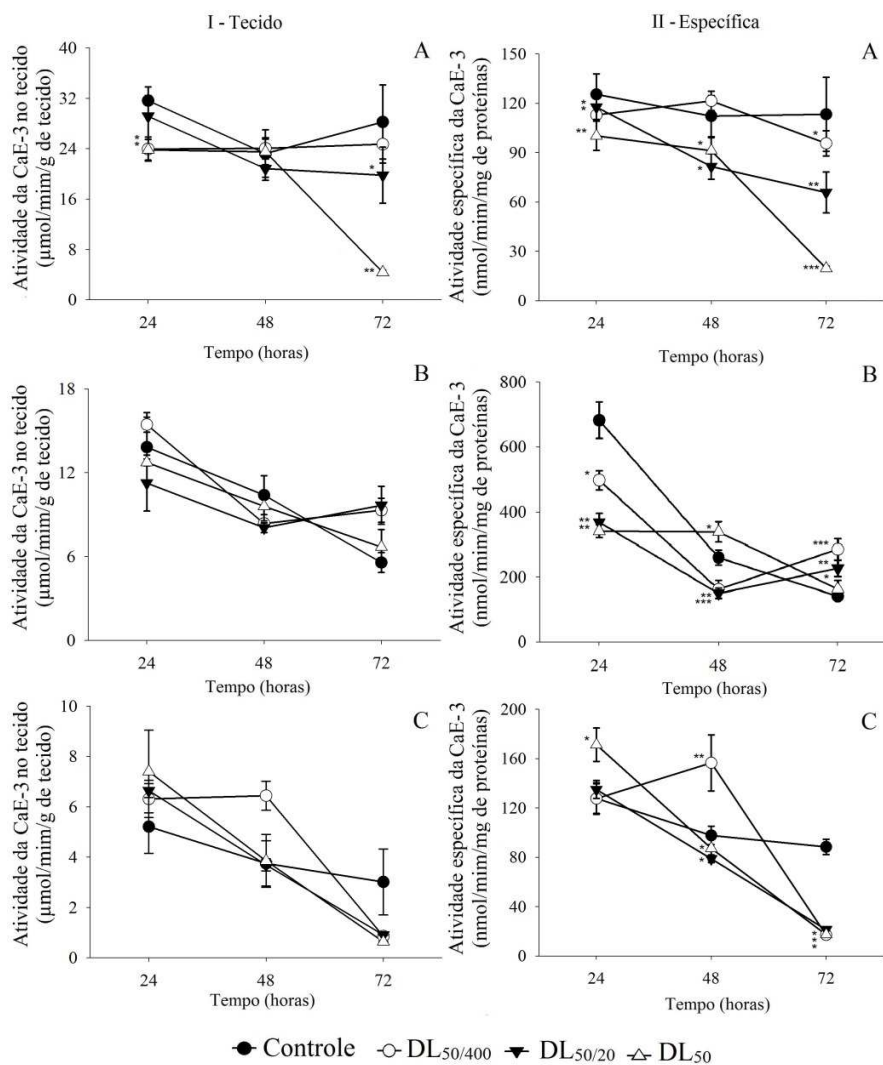


Figura 4 Atividade da carboxilesterase (CaE-3) em *Apis mellifera* expostas à aplicação tópica da DL<sub>50/400</sub> (0,01 ng/abelha), DL<sub>50/20</sub> (0,34 ng/abelha) e DL<sub>50</sub> (6,67 ng/abelha) de clotianidina. Os resultados são expressos como a média da atividade de tecido e a específica. Erro padrão. (A) = adultos, (B) = larvas de terceiro instar e (C) = larvas de quarto instar. \* Médias não diferem entre si pelo teste de contraste entre médias ( $p \leq 0,05$ )

Adicionalmente, a menor atividade das CaEs avaliadas pode estar relacionada com a atuação na fisiologia dos insetos, sendo um dos principais papéis dessas enzimas é auxiliar na degradação do hormônio juvenil. Nessa situação, onde a larva se prepara para a transição para a fase de pupa, os níveis desse hormônio torna-se extremamente baixo, o que justificaria a baixa atividade das CaEs (FIGUEIREDO; BITONDI; PAULINO-SIMÕES, 1996).

Notou-se diferentes padrões de respostas das isoformas de CaE para exposição as doses de clotianidina. Essa diferença possivelmente está relacionada pela existência das seis isoformas de CaE em *A. mellifera*, assim como as suas atividades no organismo (BITONDI; MESTRINER, 1983). Cada isoforma da carboxilesterase possui importante papel como biomarcador, isso porque as CaEs podem apresentar respostas distintas após a exposição aos xenobióticos (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012).

Constatou-se no presente estudo que a clotianidina alterou a atividade das três isoformas da CaEs, corroborando com Carvalho et al. (2013), que ao avaliarem a exposição de abelhas a deltametrina, espinosade e fipronil, evidenciaram alterações na atividade dessas enzimas, como também foi constatado para tiamentoxam (BADIOU-BÉNÉTEAU et al., 2012); acetamiprido, dinotefuran, pimeprozina e piridilil (BADAWY; NASR; RABEA, 2014), destacando o potencial das isoenzimas da CaE como biomarcadores.

### **3.3 Fosfatase alcalina (ALP)**

Verificou-se redução da atividade tecidual da ALP dos adultos após 24 horas da aplicação de  $DL_{50/400}$  e  $DL_{50/20}$  da clotianidina e 30% quando comparado com atividade do tratamento controle. Decorridos 48 horas constatou-se elevação da atividade da ALP no tecido independente da dose de clotianidina

aplicada. Para avaliação de 72 horas a atividade da enzima foi reduzida em aproximadamente 30% decorrente da exposição ao inseticida (Figura 5.I.A).

Para atividade específica da ALP em adultos expostos a clotianidina, observou-se elevação da atividade em no mínimo 34% para os insetos contaminados com a  $DL_{50/20}$  e  $DL_{50}$  da clotianidina, após 24. Passadas 48 horas, para os insetos expostos com a  $DL_{50/20}$  e a  $DL_{50}$  do inseticida, observou-se aumento da atividade específica da ALP em 80% em comparação ao controle. Decorridas 72 horas da exposição da clotianidina a atividade da ALP de todos os insetos contaminados com composto foi reduzida no mínimo em 30% (Figura 5.II.A).

Em L3, a clotianidina não afetou a atividade no tecido da ALP 24 e 48 horas da aplicação. Decorridos 72 horas a  $DL_{50/20}$  e  $DL_{50}$  do inseticida praticamente triplicaram a atividade no tecido em L3 (Figura 5.I.B).

A clotianidina reduziu a atividade específica da ALP em L3 independente da dose avaliada às 24 horas. Depois de 48 horas da aplicação de  $DL_{50/400}$  da clotianidina verificou-se redução na atividade específica da enzima. Efeito contrário foi observado para  $DL_{50}$  constatando-se elevação da atividade da ALP. Para 72 horas registrou-se aumento significativo da atividade específica da ALP para todas as doses da clotianidina (Figura 5.II.B).

A atividade no tecido da ALP em L4 não foi alterada pela exposição à clotianidina, independente do tempo (Figura 5.I.C). Para a atividade específica, verificou-se que a atividade da ALP em L4 foi elevada após 24 horas da exposição a  $DL_{50}$  da clotianidina, assim como para  $DL_{50/400}$  depois de 48 horas. Para 72 horas após a contaminação com a clotianidina não foi observado alterações na atividade específica da ALP (Figura 5.II.C).

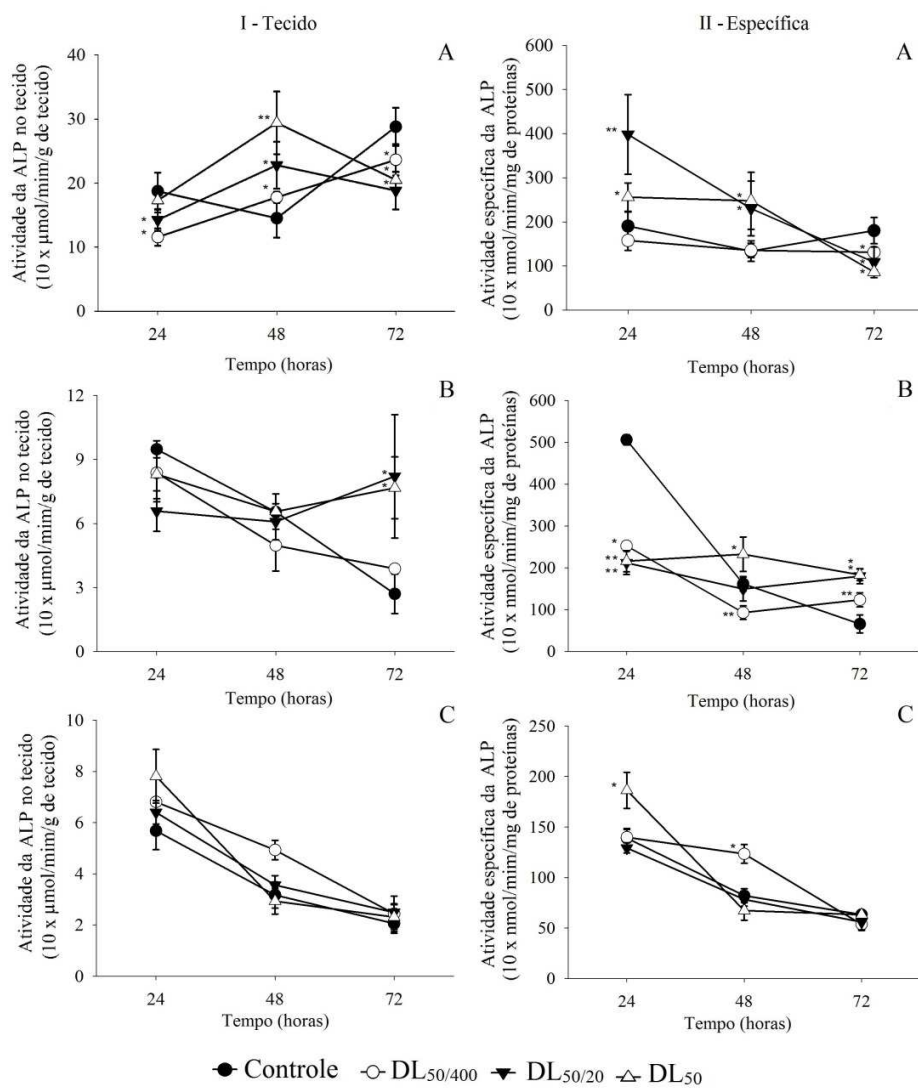


Figura 5 Atividade da fosfatase alcalina (ALP) em *Apis mellifera* expostas à aplicação tópica da DL<sub>50/400</sub> (0,01 ng/abelha), DL<sub>50/20</sub> (0,34 ng/abelha) e DL<sub>50</sub> (6,67 ng/abelha) de clotianidina. Os resultados são expressos como a média da atividade de tecido e a específica. Erro padrão. (A) = adultos, (B) = larvas de terceiro instar e (C) = larvas de quarto instar. \* Médias não diferem entre si pelo teste de contraste entre médias ( $p \leq 0,05$ )

No presente estudo, verificou-se que a clotianidina foi capaz de alterar a atividade da ALP tanto no tecido quanto a atividade específica da enzima. Assemelhando aos resultados obtidos por Carvalho et al. (2013) avaliaram a atividade da ALP no tecido de abelhas após aplicação de deltamethrina, espinosade e fipronil. Verificou-se alteração na atividade tecidual da ALP no tecido após a exposição de espinosade e fipronil. Da mesma forma, que insetos intoxicados com 2,6 ng/abelha de tiametoxam tiveram a atividade específica da ALP modificada (BADIOU-BENÉTEAU et al., 2012).

A modificação na atividade da ALP indica presença de algum fator estressante presente principalmente no intestino, como se observa na exposição da abelha a clotianidina (Figura 5). De forma semelhante, a atividade da ALP foi alterada pela presença do microsporídio *Nosema* sp. (DUSSAUBAT et al., 2012). Esse microrganismo é responsável por causar sérios danos à saúde das abelhas pela deficiência imunitária, degeneração de células epiteliais e a redução da expectativa de vida (ANTÚNEZ et al., 2009; HIGES et al., 2007; MARTIN-HERNANDEZ et al., 2011). A alteração da atividade da ALP é justificada uma vez que é um mecanismo de prevenção à invasão bacteriana reduzindo a infecção intestinal, a qual pode ser causada tanto por patógenos e/ou xenobióticos (GOLDBERG et al., 2008; MEDINA et al., 2004), o que justifica a sua utilização como biomarcador de agentes estressantes para as abelhas.

### 3.4 Glutathione S-transferase (GST)

Após 24 horas, as  $DL_{50/400}$  e  $DL_{50/20}$  da clotianidina reduziram em média 20% a atividade no tecido da GST em relação ao controle. Passadas 48 horas verificou-se aumento da atividade no tecido da GST nos insetos expostos a  $DL_{50}$  da clotianidina. Por fim, decorridas 72 horas da exposição da  $DL_{50/20}$  e  $DL_{50}$  da clotianidina, observou-se redução da atividade da GST no tecido em 35%

(Figura 6.I.A).

Decorridas 24 horas, verificou-se a elevação da atividade específica da GST para adultos expostos as  $DL_{50/400}$  e  $DL_{50/20}$  da clotianidina, verificando-se a elevação da atividade nos insetos expostos a doses subletais do inseticida. Após 48 horas, registrou-se aumento na atividade da GST para os insetos expostos a  $DL_{50/400}$  da clotianidina. Passadas 72 horas da contaminação das abelhas com as  $DL_{50/20}$  e  $DL_{50}$  do composto, verificou-se a redução da atividade específica da GST (Figura 6.II.A).

A atividade no tecido da GST em L3 não foi alterada pela presença da clotianidina independente do tempo de avaliação, com média de 8,7; 9,1 e 9,2  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido para 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 6.I.B).

Para a atividade específica da GST, após 24 horas da aplicação, todas as doses avaliadas da clotianidina reduziram a atividade da enzima, com média inferior a 300  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína. Decorridas 48 horas da aplicação do inseticida, verificou-se que não houve diferença significativa na atividade enzimática entre os tratamentos avaliados, com média de 228  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína. Após 72 horas as  $DL_{50/20}$  e  $DL_{50}$  reduziram a atividade da GST, em que foi observado média de 194,6  $\text{nmol/mim/mg}$  de proteína, enquanto o tratamento controle foi de 272,7  $\text{nmol/mim/mg}$  (Figura 6.II.B).

Para L4, após 24 horas não foram observadas diferenças significativas na atividade no tecido da GST entre os tratamentos, com média na atividade de 6,8  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido. De forma semelhante para 48 e 72 horas após a aplicação da clotianidina, não foram observadas alterações na atividade no tecido da GST em larvas, com médias de 6,2 e 5,7  $\mu\text{mol/mim/g}$  de tecido, respectivamente (Figura 6.I.C).

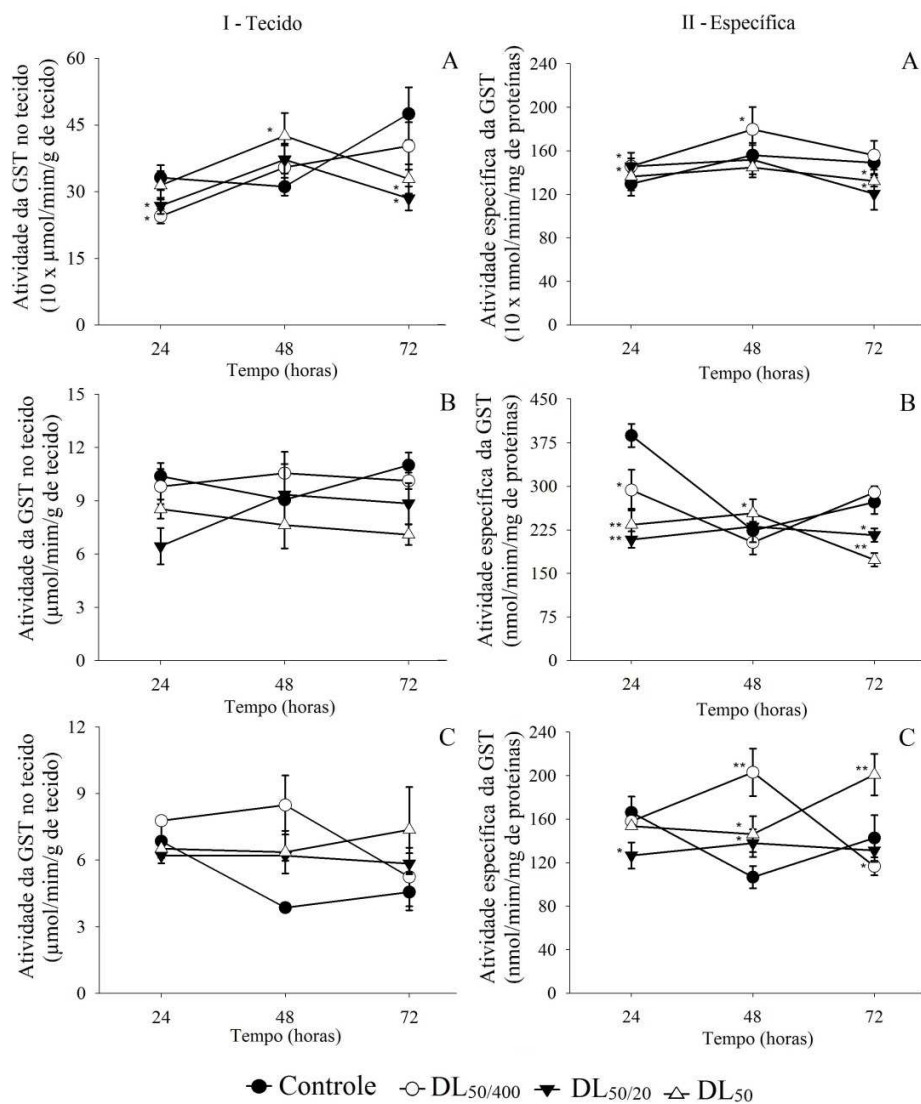


Figura 6 Atividade da glutationa S-transferase (GST) em *Apis mellifera* expostas à aplicação tópica da DL<sub>50/400</sub> (0,01 ng/abelha), DL<sub>50/20</sub> (0,34 ng/abelha) e DL<sub>50</sub> (6,67 ng/abelha) de clotianidina. Os resultados são expressos como a média da atividade de tecido e a específica. Erro padrão. (A) = adultos, (B) = larvas de terceiro instar e (C) = larvas de quarto ínstar. \* Médias não diferem entre si pelo teste de contraste entre médias ( $p \leq 0,05$ )

Transcorridas 24 horas da aplicação da clotianidina, apenas a DL<sub>50/20</sub> reduziu a atividade específica da GST de L4, com média na atividade de 126,5 nmol/mim/mg de proteína, contra 166,1 nmol/mim/mg do tratamento controle. Para 48 horas após a aplicação, as três doses de clotianidina avaliadas aumentaram a atividade específica com médias superiores a 135 nmol/mim/mg de proteína, enquanto o tratamento controle foi de 106,6 nmol/mim/mg. Passadas 72 horas da aplicação da clotianidina, apenas a DL<sub>50</sub> aumentou a atividade específica da enzima, com média de 200,8 nmol/mim/mg de proteína, o que representou aumento de 40% na atividade enzimática em relação ao controle, enquanto que a DL<sub>50/400</sub> reduziu em 20% a atividade da GST, com média de 116 nmol/mim/mg de proteína (Figura 6.II.C).

Em trabalho realizado por Badiou-Benéteau et al. (2012), constataram alterações na atividade (tecido/específica) da GST devido a exposição de abelhas ao tiametoxam. Os inseticidas deltametrina e espinosade alteraram a atividade específica da GST após exposição de abelhas (CARVALHO et al., 2013). Igualmente, a atividade da GST em abelhas foi afetada pela a exposição de permetrina (YU; ROBINSON; NATION, 1984), parationa-metflica e decametrina (PAPADOPOULOS et al., 2004). Resultados semelhantes foram obtidos no presente estudo, em que a atividade (tecido/específica) da GST foi afetada após a exposição dos insetos a clotianidina (Figura 6).

De modo geral, as abelhas expostas com a clotianidina tiveram reduzidas as atividades das enzimas nas primeiras 24 horas em comparação ao controle. Decorridas 48 horas da aplicação do inseticida constatou-se elevação da atividade enzimática. Por fim, passadas 72 horas a atividade das enzimas apresentaram atividade semelhante ao tratamento controle ou reduziram suas atividades. Em estudo realizado por Suchail, Debrauwer e Belzunces (2003), no qual avaliaram o metabolismo do imidacloprido em *A. mellifera*, observou-se comportamento semelhante ao observados para clotianidina no presente estudo.

Primeiramente, foi constatado hiperatividade e tremores como os primeiros sintomas de intoxicação causados pelo imidacloprido, posteriormente as abelhas tornaram-se hipoativas. Nesse trabalho, com estudos de toxicocinética, verificaram que logo após exposição das abelhas à presença de 50% imidacloprido, 9% 5-hidroxi-imidacloprido e 8% olefin, esses dois últimos metabólitos do imidacloprido. No segundo momento, seis horas após intoxicação foi detectado 10% de imidacloprido, enquanto para 5-hidroxi-imidacloprido e olefin foi de 14% e 9%, respectivamente. Contudo, depois de 48 horas os níveis detectados para imidacloprido e seus metabólitos foram inferiores a 5%. Suchail, Debrauwer e Belzunces (2003) sugeriram que a neurotoxicidade inicial foi induzida preferencialmente por imidacloprido, e considerou que os dois metabólitos com ou sem o imidacloprido residual estavam envolvidos na mortalidade das abelhas. A cinética demonstrada para imidacloprido permite imaginar que o mesmo pode ter ocorrido para clotianidina, porém, até o presente momento não houve descrição dessa magnitude para o inseticida estudado em abelhas, sendo de forma semelhante ao imidacloprido, que seus principais metabólitos são 5-hidroxi-imidacloprido e olefin, os principais metabólitos da clotianidina são o N-desmetil-clotianidina e/ou 2-Clorotiazol-5-acido carboxílico (CASIDA, 2011; FORD; CASIDA, 2006; YOKOTA et al., 2003).

O processo de intoxicação das abelhas com clotianidina depende da forma e do tempo exposição, assim como da dose aplicada (HASSANI et al., 2008). A não detecção do efeito letal nos insetos expostos aos inseticidas não implica que o organismo está integralmente funcional. Isto é particularmente verdadeiro se considerar que os xenobióticos podem induzir a diversos efeitos subletais, como a alteração na capacidade de voo, na aprendizagem associativa ou redução no desempenho no aprendizado das abelhas, o aumento da sensibilidade a *Nosema* sp., alteração na capacidade de forrageamento e

desenvolvimento das larvas (CARVALHO et al., 2013; DECOURTYE et al., 2005; MORANDIN et al., 2005; ROAT et al., 2013; VANDAME et al., 1995; VIDAU et al., 2011).

Assim, como a presença da clotianidina foi capaz de modular a atividade das enzimas avaliadas nesse estudo, Prisco et al. (2012) verificaram que esse inseticida alterou a atividade do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), importante complexo proteico que auxilia o sistema imunológico das abelhas na resposta imunitária de infecções, dentre as quais a DWV (vírus da asa deformada) resultante do parasitismo pela ação da *V. destructor*, podendo afetar processos vitais das abelhas, comprovando que a exposições aos neonicotinoides podem debilitar o sistema imunológico das abelhas e contribuir na explicação da ocorrência do declínio das colônias das abelhas.

O conhecimento e avaliação de biomarcadores são fundamentais para legitimar sua capacidade como ferramenta de avaliação. Uma etapa preliminar, mas fundamental, é a determinação da sensibilidade e do potencial de alteração na atividade do sensor por um xenobiótico, no caso as enzimas das abelhas e a clotiandina. Contudo, a resposta específica da abelha pode ser modificada conforme fatores abióticos e bióticos, como por exemplo, o estado fisiológico, a origem, a herança genética e a época do ano (HARRIS; WOODRING, 1992; SMIRLE, 1993; SMIRLE; WINSTON, 1987; SUCHAIL; GUEZ; BELZUNCES, 2000).

Abelhas são consideradas organismos vulneráveis aos inseticidas, sendo que um dos possíveis fatores está relacionado à constituição do seu genoma, por possuir menor quantidade de genes que codifica as enzimas desintoxicantes de xenobióticos em comparação com outros insetos (CLAUDIANOS et al., 2006). As enzimas que protegem o organismo contra xenobióticos são reconhecidas como biomarcadores sensíveis, especialmente aqueles envolvidos em processos de estresse oxidativo e de desintoxicação (CARVALHO et al., 2013). Em

conjunto citocromo P450, GST e CaEs são as principais enzimas responsáveis pela maioria dos processos de desintoxicação (CLAUDIANOS et al., 2006), assim como as hidrolases, epoxidases e O-demetilases que auxiliam o sistema na remoção dos compostos (GILBERT; WILKINSON, 1974; YU; ROBINSON; NATION, 1984).

Portanto, quando um conjunto de enzima demonstram alterações nas suas atividades resultantes da exposição a diferentes inseticidas ou a doses diferentes de um único inseticida, essas podem apresentar potencial de uso como biomarcadores. A escolha de biomarcadores é um passo crucial na avaliação da saúde individual, da colônia e ambiental. Os resultados apresentados no presente estudo destacam a aplicabilidade das enzimas AChE, ALP, CaEs e GST como biomarcadores e evidência a abelha como um bioindicador importante da presença de insecticidas no ambiente (CARVALHO et al., 2013).

#### 4 CONCLUSÕES

- A clotianidina foi tóxica para adultos e larvas do poliíbrido africanizado *A. mellifera*;
- Doses subletais de clotianidina induziram a diferentes padrões de comportamento da atividade enzimática de *A. mellifera* africanizada;
- Mesmo apresentando padrões distintos, as enzimas acetilcolinesterase, carboxilesterase, fosfatase alcalina e glutatona S-transferase demonstraram potencial para serem utilizadas como biomarcadores da presença de inseticidas.

## REFERÊNCIAS

AGUILERA, C. et al. Pollution biomarkers in the spiny lizard (*Sceloporus* spp.) from two suburban populations of Monterrey, Mexico. **Ecotoxicology**, London, v. 21, n. 8, p. 2103-2112, Nov. 2012.

ANTÚNEZ, K. et al. Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 9, p. 2284-2290, Sept. 2009.

ARMSTRONG, R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 10, n. 1, p. 2-18, Jan. 1997.

AUPINEL, P. et al. Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, Bologna, v. 58, n. 2, p. 107-111, 2005.

AUPINEL, P. et al. Toxicity of dimetoate and fenoxycarb to honeybee brood (*Apis mellifera*) using a new in vitro standardized feeding method. **Pest Management Science**, Sussex, v. 63, n. 11, p. 1090-1094, Nov. 2007.

BADAWY, M. E. I.; NASR, H. M.; RABEA, E. I. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. **Apidologie**, Versailles, v. 46, n. 2, p. 177-193, Mar. 2015.

BADIOU, A.; MELED, M.; BELZUNCES, L. P. Honeybee *Apis mellifera* acetylcholinesterase - A biomarker to detect deltamethrin exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 69, n. 2, p. 246-253, Feb. 2008.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A. et al. Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honeybee *Apis mellifera*: application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 82, p. 22-31, Aug. 2012.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A. et al. Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. **Environment International**, New York, v. 60, p. 31-41, Oct. 2013.

BELZUNCES, L. P.; LENOIR-ROUSSEAUX, J. J.; BOUNIAS, M. Properties of acetylcholinesterase from *Apis mellifera* heads. **Insect Biochemistry**, London, v. 18, n. 8, p. 811-819, 1988.

BELZUNCES, L. P.; TCHAMITCHIAN, S.; BRUNET, J. L. Neural effects of insecticides in the honey bee. **Apidologie**, Versailles, n. 3, v. 43, p. 348-370, May 2012.

BENZIDANE, Y. et al. Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, n. 12, p. 1351-1359, Dec. 2010.

BESSEY, O. A.; LOWRY, O. H.; BROCK, M. J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimetres of serum. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 164, p. 321-329, July 1946.

BITONDI, M. M. G.; MESTRINER, M. A. Esterase isozymes of *Apis mellifera*: substrate and inhibition characteristics, developmental ontogeny and electrophoretic variability. **Biochemical Genetics**, New York, v. 21, n. 9/10, p. 985-1002, Oct. 1983.

BOILY, M. et al. Acetylcholinesterase in honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 20, n. 8, p. 5603-5614, Aug. 2013.

BOOTH, J.; BOYLAND, E.; SIMS, P. An enzyme from rat liver catalyzing conjugations with glutathione. **Biochemical Journal**, London, v. 79, n. 3, p. 516-524, June 1961.

BOUNIAS, M.; DUJIN, N.; POPESKOVIC, D. S. Sublethal effects of a synthetic pyrethroid, deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alkaline phosphatases of honeybees. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 24, n. 2, p. 149-160, Oct. 1985.

BOUNIAS, M. et al. Toxicology of cupric salts on honeybees: V. gluconate and sulfate action on gut alkaline and acid phosphatase. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 35, n. 1, p. 67-76, Oct. 1996.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.

CASIDA, J. E. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes, organisms, and relevance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 7, p. 2923-2931, Apr. 2011.

CARVALHO, S. M. et al. Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honeybee *Apis mellifera* to insecticides. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 32, n. 9, p. 2117-2124, Sept. 2013.

CHAUZAT, M. P. et al. Influence of pesticides residues in honeybee (Hymenoptera: Apidae) colony health in France. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, n. 3, p. 514-523, June 2009.

CLAUDIANOS, C. et al. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 615-636, Oct. 2006.

COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, Palo Alto, v. 21, p. 441-483, June 1992.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas**: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 2009. 408 p.

DARY, O. et al. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, n. 6, p. 2187-2192, Dec. 1990.

DECOURTYE, A. et al. Comparative sub-lethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 48, n. 2, p. 242-250, Feb. 2005.

DELAGE-DARCHEN, B.; CONCONI, J. R. D.; AGUILAR, C. Comparaison entre l'équipement enzymatique des glandes salivaires et l'intestin moyen de diverses espèces d'abeilles sociales. **Apidologie**, Versailles, v. 13, n. 3, p. 265-273, 1982.

DUSSAUBAT et al. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-11, Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0037017&representation=PDF>>. Acesso em: 27 jan. 2015.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 7, n. 2, p. 88-95, July 1961.

ENAYATI, A. A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 3-8, Jan. 2005.

FIGUEIREDO, V. L. C.; BITONDI, M. M. G.; PAULINO-SIMÕES, Z. L. Esterase inhibition during several immature worker stages of *Apis mellifera* following topical application of DDVP insecticide. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 35, n. 1, p. 37-43, Jan. 1996.

FORD, K. A.; CASIDA, J. E. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, n. 11, p. 1549-1556, Nov. 2006.

FOURNIER, D. et al. Insect glutathione S-transferases: biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 3, p. 1840-1845, Jan. 1992.

GILBERT, M. D.; WILKINSON, C. F. Microsomal oxidases in the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 4, n. 1, p. 56-66, Mar. 1974.

GOLDBERG, R. F. et al. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of American**, Washington, v. 105, n. 9, p. 3551-3556, Mar. 2008.

GOMORI, G. Human esterases. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 42, n. 3, p. 445-453, Sept. 1953.

GREGORC, A.; BOWEN, I. D. Programmed cell death in the honey-bee (*Apis mellifera* L.) larvae midgut. **Cell Biology International**, London, v. 21, n. 3, p. 151-158, Mar. 1997.

GUNNING, R.V.; MOORES, G. D.; DEVONSHIRE, A. L. Esterases and fenvalerate resistance in a field population of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 58, n. 2, p. 155-162, June 1997.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione *S*-transferase: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, Nov. 1974.

HARRIS, J. W.; WOODRING, J. Effects of stress, age, season and source colony on levels of octopamine, dopamine and serotonin in the honeybee (*Apis mellifera* L.) brain. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 29-35, Jan. 1992.

HASSANI, A. K. E. et al. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 54, n. 4, p. 653-661, May 2008.

HENDRISKMA, H. P.; HÄRTEL, S.; STEFFAN-DEWENTER, I. Honey bee risk assessment: new approaches for in vitro larvae rearing and data analyses. **Methods in Ecology and Evolution**, London, v. 2, n. 5, p. 509-517, Oct. 2011.

HIGES, M. et al. Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 94, n. 3, p. 211-217, Mar. 2007.

LEITA, L. et al. Investigation of the use of honeybees and honeybee products to assess heavy metals contamination. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 43, n. 1, p. 1-9, Oct. 2004.

MARTIN-HERNANDEZ, R. et al. Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). **Parasitology Research**, Berlin, v. 109, n. 3, p. 605-612, Sept. 2011.

MEDINA, F. S. D. et al. Induction of alkaline phosphatase in the inflamed intestine: a novel pharmacological target for inflammatory bowel disease. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 68, n. 12, p. 2317-2326, Dec. 2004.

MORANDIN, L. A. et al. Lethal and sub-lethal effects of spinosad on bumble bees (*Bombus impatiens* Cresson). **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, n. 7, p. 619-626, July 2005.

NGUYEN, B. K. et al. Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 2, p. 616-623, Apr. 2009.

O'BRIEN. Acetylcholinesterase and its inhibition. In: WILKINSON, C. F. **Insecticide biochemistry and physiology**. New York: Plenum, 1976. chap. 7, p. 271-296.

PAPADOPOULOS, A. I. et al. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica* kinetic characteristics and effect of stress on the expression of gst isoenzymes in the adult worker bee. **Comparative Biochemistry and Physiology: Part C. Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 139, n. 1/3, p. 93-97, Oct. 2004.

PRISCO, G. D. et al. Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of American**, Washington, v. 110, n. 46, p. 18466-18471, Nov. 2012.

RANSON, H. et al. Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 379-386, Aug. 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2014. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ROAT, T. C. et al. Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of africanized honeybees. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 64, n. 3, p. 456-466, Apr. 2013.

SATOH, T.; HOSOKAWA, M. The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 38, p. 257-288, Apr. 1998.

SMIRLE, M. J. The influence of colony population and brood rearing intensity on the activity of detoxifying enzymes in worker honeybees. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 420-424, Dec. 1993.

SMIRLE, M. J.; WINSTON, M. L. Intercolony variation in pesticide detoxification by the honeybee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 80, n. 1, p. 5-8, Feb. 1987.

STOK, J. E. et al. Identification, expression, and purification of a pyrethroidhydrolyzing carboxylesterase from mouse liver microsomes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 28, p. 29863-29869, July 2004.

SUCHAIL, S.; DEBRAUWER, L.; BELZUNCES, L. P. Metabolismo of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, n. 3, p. 291-296, Mar. 2003.

SUCHAIL, S.; GUEZ, D.; BELZUNCES, L. P. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 19, n. 7, p. 1901-1905, July 2000.

TERRA, W. R. et al. Digestive enzymes. In: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. chap. 6, p. 153-194.

VAN ASPEREN, K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 401-416, July/Aug. 1962.

VANDAME, R. et al. Alteration of the homing-flight in the honeybee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 14, n. 5, p. 855-886, May 1995.

VANDENBERG, J. D.; SHIMANUKI, H. Technique for rearing worker honeybees in the laboratory. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 26, n. 2, p. 90-97, June 1987.

VIDAU, C. et al. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2011. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0021550&representation=PDF>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

YOKOTA, T. et al. Absorption, tissue distribution, excretion, and metabolism of clothianidin in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 24, p. 7066-7072, Nov. 2003.

YU, S. J.; ROBINSON, F. A.; NATION, J. L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 22, n. 3, p. 360-368, Dec. 1984.

WHEELLOCK, C. E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **The Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 30, n. 2, p. 75-83, June 2005.

WU, W. et al. Honeybees can discriminate between Monet and Picasso paintings **Journal of Comparative Physiology: A Sensory, Neural and Behavioral Physiology**, New York, v. 199, n. 1, p. 45-55, Jan. 2013.

ZENTALL, T. et al. Concept learning in animals. **Comparative Cognition and Behavior Reviews**, Edmonton, v. 3, p. 13-45, 2008.