

25. Meio ambiente

Efeitos tardios da co-exposição larval a doses realísticas do inseticida clotianidina e do fungicida piraclostrobina: avaliação da longevidade das operárias adultas de *Apis mellifera* africanizada

Tadei, Rafaela; Menezes, Aparecido J.; Silva-Zacarin, Elaine C. M.

rafaelatadei@gmail.com; jrquimenezes@gmail.com; elaine@ufscar.br

Programa de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Universidade Federal de São Carlos

Resumo

Nos últimos anos, as abelhas vêm sofrendo um declínio populacional que afeta os serviços ecossistêmicos de polinização, dentre os fatores desse declínio estão os agrotóxicos. Com o objetivo de avaliar o efeito da exposição a uma mistura do inseticida clotianidina e do fungicida piraclostrobina no desenvolvimento de *Apis mellifera* africanizada, larvas de primeiro instar obtidas de três colônias foram transferidas para cúpulas com dieta artificial padronizada. Realizou-se exposição repetida por via oral nas larvas, do terceiro ao sexto dia do bioensaio. O consumo total do inseticida foi de 0,2364 ng/larva e do fungicida de 23,63 ng/larva. Avaliou-se a longevidade das abelhas emergidas e realizou a caracterização química dos compostos por infravermelho. Os agrotóxicos não apresentaram efeitos deletérios nas larvas e pupas. Entretanto, as abelhas expostas ao inseticida isolado e aos dois agrotóxicos combinados apresentaram redução na longevidade dos adultos emergidos ($p < 0,01$). O decréscimo no tempo de sobrevivência foi maior no grupo exposto apenas ao inseticida, sendo que a presença do fungicida no grupo co-exposto atenuou este decréscimo na longevidade, possivelmente por uma interação dos compostos químicos dos agrotóxicos, evidenciada pela mudança no padrão do espectrograma. O fungicida isolado não alterou a longevidade das abelhas ($p > 0,1$). A co-exposição pode ter diminuído a toxicidade do inseticida por meio de interações químicas e/ou facilitado o processo de desintoxicação destes xenobióticos no organismo, reduzindo a mortalidade. Do ponto de vista da dinâmica populacional da colônia, estes dados são preocupantes, visto que as concentrações dos agrotóxicos foram encontradas nos recursos alimentares das abelhas.

Palavras chave: abelhas, agrotóxicos, neonicotinóide, desenvolvimento

Introdução

Atualmente, diversos países, incluindo o Brasil, vêm sofrendo com um declínio de

populações de abelhas (Johnson, Ellis, Mullin, & Frazier, 2010; Lee et al., 2015; Pires et al., 2016), afetando tanto o equilíbrio do meio ambiente, como o setor econômico alimentício (Brandt, Gorenflo, Siede, Meixner, & Büchler, 2016; Budge et al., 2015). As evidências ao crescente declínio de populações de abelhas apontam combinações múltiplas de fatores bióticos e abióticos, dentre eles destacam-se os agrotóxicos (Goulson, Nicholls, Botias, & Rotheray, 2015; Nicholls, Fowler, Niven, Gilbert, & Goulson, 2017; Simon-Delso et al., 2014).

Dentre os agrotóxicos encontrados em matrizes apícolas (pólen, néctar e mel) estão os inseticidas da classe neonicotinóide (Byrne et al., 2014; Pohorecka, Szczęśna, Witek, Miszczak, & Sikorski, 2017; Schmuck & Lewis, 2016), e os fungicidas da classe estrobilurina (Simon-Delso, San Martin, Bruneau, Hautier, & Medrzycki, 2017), ambos de ação sistêmica na planta. Os agrotóxicos sistêmicos, translocam-se pela seiva da planta chegando até o pólen e néctar, são persistentes e móveis no meio ambiente (Decourtye & Devillers, 2010; Sánchez-Hernández et al., 2016). As abelhas forrageiras coletam esse pólen e néctar potencialmente contaminados e levam até a colônia, causando uma cascata de contaminação intra-colonial, tanto das abelhas adultas como das larvas (Fine,

Cox-Foster, & Mullin, 2017; Zhu, Schmehl, Mullin, & Frazier, 2014).

De forma isolada, estudos mostraram que inseticidas neonicotinóides causam efeitos deletérios em abelhas, como mudanças comportamentais (Alkassab & Kirchner, 2018; Williamson, Willis, & Wright, 2014), danos nas glândulas hipofaríngeas das abelhas nutridoras (Wessler et al., 2016) e aumento da susceptibilidade de abelhas às infecções por patógenos (Di Prisco et al., 2013). Os efeitos isolados dos fungicidas são pouco conhecidos, porém já foram relacionados com efeitos adversos em abelhas (Domingues et al., 2017; Menezes et al., 2015). Ademais, a probabilidade de distúrbios ocorrerem quando a colônia possui resíduos de dois ou mais fungicidas aumenta para até 88% (Simon-Delso et al., 2014).

Os efeitos das combinações de diversos agrotóxicos não são conhecidos. A combinação de inseticidas e fungicidas pode aumentar ainda mais a toxicidade e efeitos deletérios sobre as colônias (Goulson et al., 2015; Johnson et al., 2010; Sanchez-Bayo & Goka, 2014; Thompson & Wilkins, 2003).

Devido ao cenário atual da diminuição das populações de abelhas, as ameaças à produção de alimentos e escassez de estudos de toxicidade larval (Simon-Delso et al., 2014), o presente estudo auxiliará na compreensão dos efeitos à exposição

de agrotóxicos em larvas de abelhas (Brandt et al., 2016; Budge et al., 2015; Desneux, Decourtye, & Delpuech, 2007), além de atender à necessidade da comunidade científica de pesquisas sobre efeitos combinados de inseticidas e fungicidas (Berenbaum, 2016; Nicholls et al., 2017; Sanchez-Bayo & Goka, 2014; Simon-Delso et al., 2017).

Objetivos

Avaliar o efeito tardio (longevidade pós-emergência) da exposição larval de operarias de *Apis mellifera* africanizada ao inseticida clotianidina e ao fungicida piraclostrobina de forma isolada e combinado.

Materiais e métodos

Larvas de primeiro instar de três colônias saudáveis de *A. mellifera* africanizada foram transferidas para cúpulas contendo alimento artificial segundo a OECD nº 239 (OECD, 2016), em 12 placas de cultura de 48 poços divididas em 4 blocos.

Do terceiro ao sexto dia o alimento, oferecido as larvas, foi contaminado com agrotóxico conforme cada grupo experimental: I) Controle (n=96), II) Controle solvente (n=95), III) Inseticida neonicotinóide Clotianidina (n=95), IV) Fungicida estrobilurina Piraclostrobina (n=96), V) Combinação do inseticida e fungicida na mesma concentração da

exposição aos agrotóxicos isolados (n=96). O consumo total (“intake”) foi de 23,63 ng/larva do fungicida e 0,2364 ng/larva do inseticida.

Concomitantemente realizou-se a exposição repetida ao inseticida dimetoato na concentração 200 ng.µL⁻¹ (composto químico padrão) para validação do bioensaio. Todas as larvas foram mantidas em uma caixa hermética à 34±2°C, na ausência de luz, e com umidade relativa de 95 ± 5%.

A mortalidade larval foi registrada a cada 24 horas após o oferecimento da dieta contaminada com os agrotóxicos. As observações na fase pupal, tiveram intervalos de 24 a 48 h entre elas até o dia 15 do experimento.

Para avaliar a longevidade dos adultos, os indivíduos foram alimentados com solução aquosa de açúcar invertido 1:1 (trocado a cada dois dias) e o bioensaio somente finalizou com a morte da última abelha. O bioensaio de larva a adulto teve duração total de 38 dias.

Adicionalmente, caracterizou-se os agrotóxicos puros isolados e combinados por espectroscopia FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) de forma a subsidiar a interpretação dos resultados. A leitura foi realizada pelo software OMNIC em uma pastilha de KBr na proporção 100:1 KBr/amostra.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do

programa R, por meio de GLM - modelo linear generalizado, com distribuição binomial e quasibinomial. Utilizou-se a análise de resíduos pelo Half-normal plot para visualizar a adequabilidade dos dados. Considerou-se diferenças significativas com $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Não houve diferença significativa entre a mortalidade larval dos grupos controle e dos grupos expostos ($p > 0,9$), em todos a mortalidade acumulada do D4 ao D7 não ultrapassou 12% (tabela 1). As larvas expostas ao dimetoato apresentaram mortalidade média de $94,01 \pm 0,74$ % ($p < 0,01$), validando o bioensaio. Os grupos experimentais não diferiram quanto a mortalidade pupal ($p > 0,7$), taxa de pupação ($p > 0,1$) e taxa de emergência ($p > 0,2$), tabela 1.

A exposição ao inseticida durante a fase larval reduziu a longevidade das abelhas jovens ($p < 0,01$, figura 1). As abelhas expostas aos dois agrotóxicos durante a fase larval também apresentaram longevidade menor quando

comparada ao controle ($p < 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre a longevidade dos grupos controle, controle solvente ($p > 0,9$) e das abelhas expostas ao fungicida ($p > 0,1$).

A longevidade dos indivíduos expostos ao fungicida de forma isolada não diferiu dos indivíduos expostos aos dois agrotóxicos ($p > 0,1$), porém o efeito sobre a longevidade do inseticida isolado foi maior que o efeito deste na forma combinada com o fungicida ($p < 0,01$).

Em relação aos dados de espectroscopia FTIR, a maioria das bandas presentes nos espectros dos agrotóxicos isolados apareceram na mistura dos dois agrotóxicos, algumas das bandas ausentes no espectro da combinação dos agrotóxicos podem ter sofrido sobreposição (figura 2). Na região "fingerprint" do espectro ($1300-900 \text{ cm}^{-1}$), 63,6% das bandas foram iguais as observadas no fungicida piraclostrobina. As bandas presentes nos espectros na região $1600-1300 \text{ cm}^{-1}$ de intensidade forte e média indicam as estruturas aromáticas

Tabela 1. Mortalidade (média \pm erro padrão) de larvas e pupas, e taxa de pupação e emergência de *Apis mellifera* africanizada.

Grupo experimental	Mortalidade média		Taxa (%)	
	Larva (%)	Pupa (%)	Pupação	Emergência
Controle	$9,38 \pm 0,73$	$13 \pm 2,0$	$93 \pm 0,83$	$77,20 \pm 1,07$
Controle solvente	$10,42 \pm 0,82$	$12 \pm 1,4$	$97 \pm 0,23$	$84,18 \pm 0,42$
Inseticida	$9,47 \pm 0,54$	$21 \pm 2,71$	$87 \pm 0,91$	$86,23 \pm 0,74$

Fungicida	11.46 ± 0.81	19 ± 1.96	88 ± 0.88	86.25 ± 0.37
Co-exposición	10.42 ± 0.25	11 ± 1.53	93 ± 0.27	88.73 ± 1.24

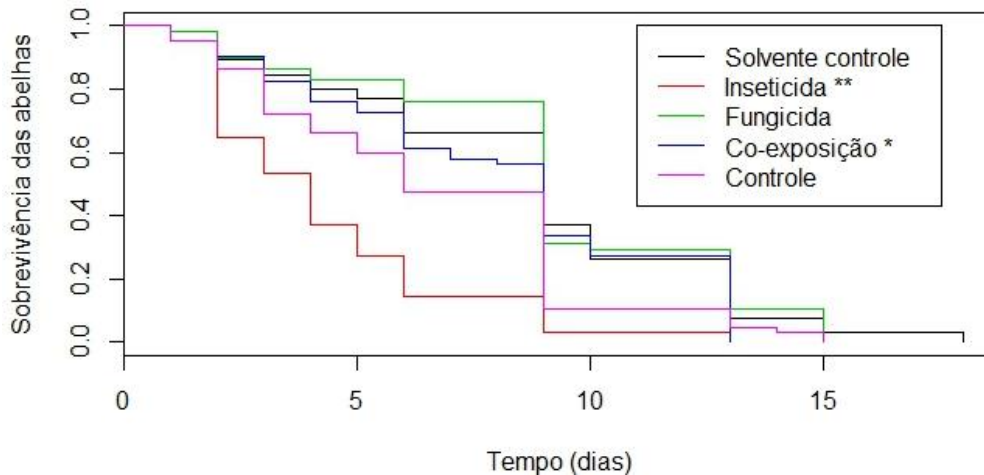


Figura 1. Tempo de sobrevivência de abelhas operárias após a emergência. R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

e heteroaromáticas dos compostos (Lopes & Fascio, 2004; Silverstein, Webster, & Kiemle, 2005).

O fungicida piraclostrobina atua na inibição da respiração mitocondrial pela ligação ao domínio proximal do grupo heme no sítio Qo do citocromo b (Fisher & Meunier, 2008). Na baixa dose utilizada, não houve alteração do desenvolvimento

pós-embrionário. Outros fungicidas, mesmo em doses baixas, causaram efeitos deletérios, como prejuízos no desenvolvimento larval pela exposição à fungicidas das classes dicarboximida e dimetilcarbamato (Mussen, Lopez, & Peng, 2004) e redução na longevidade dos

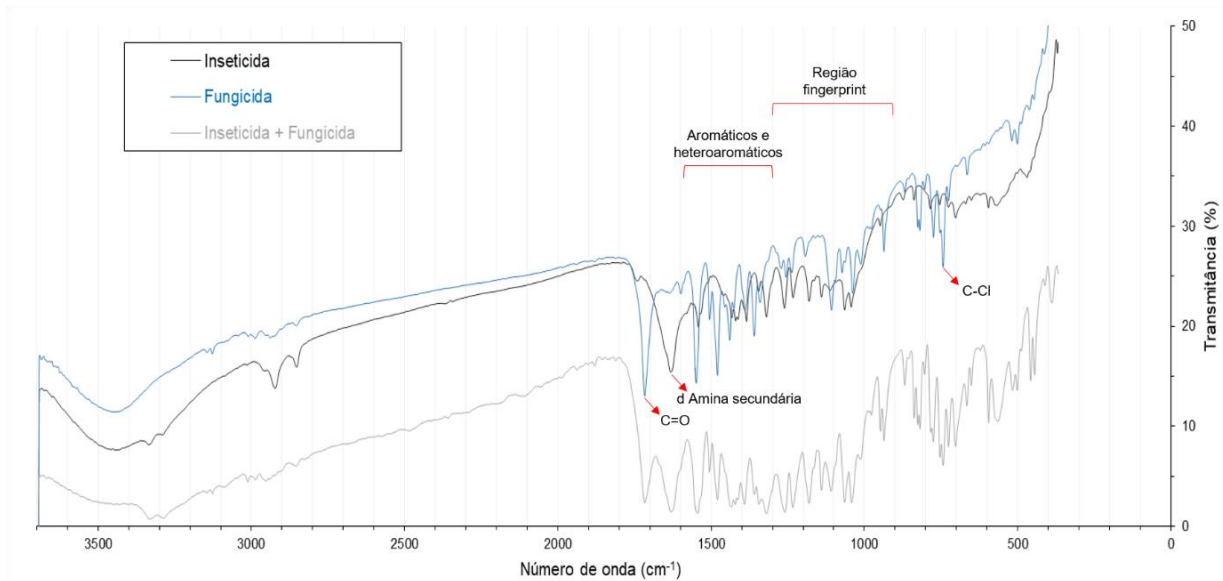


Figura 2. Espectro de FTIR do inseticida clotianidina e do fungicida piraclostrobina (d: dobramento).

indivíduos adultos expostos cronicamente ao picoxistrobina da classe estrobilurina (Domingues et al., 2017).

Em combinação com fitoquímicos presentes no pólen (exemplo, quercetin), os fungicidas podem afetar tanto a habilidade de desintoxicação das abelhas mediada pelo citocromo P450 quanto o complexo II/III da cadeia respiratória das mitocôndrias (Mao, Schuler, & Berenbaum, 2017). Dessa forma, fungicidas como o piraclostrobina podem causar danos significativos as abelhas de mel, em baixas doses, quando ingeridas durante a fase larval, inclusive quando em combinação com outros agrotóxicos presentes nos recursos florais coletados pelas abelhas, podendo prejudicar a saúde da abelha e da colônia.

O inseticida clotianidina em contato com a abelha adulta causa despolarização

das células de Kenyon, que são neurônios localizados nos corpos pedunculados do cérebro, pela ligação aos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) e atua como bloqueador desses receptores colinérgicos em exposições prolongadas, podendo prejudicar funções cognitivas nas abelhas (David, Botías, Abdul-Sada, Goulson, & Hill, 2015; Fischer et al., 2014; Laurino, Porporato, Patetta, & Manino, 2011).

Larvas de *A. mellifera* africanizada expostas ao inseticida neonicotinóide tiametoxam sofreram morte celular prematura em seus lobos ópticos (Tavares, Roat, Carvalho, Silva-Zacarin, & Malaspina, 2015), podendo comprometer a acuidade visual e desorientação nas abelhas adultas ao processar uma quantidade menor de informações visuais nos corpos pedunculados.

Adicionalmente, o inseticida tiametoxam causou danos celulares no intestino médio, túbulos de Malpighi e em células de Kenyon do cérebro, em abelhas recém-emergidas expostas durante a fase larval ao tiametoxam em concentração 1 µg/L, similar à utilizada neste estudo (Friol, Catae, Tavares, Malaspina, & Roat, 2017). Estas alterações morfológicas e teciduais, e suas consequências podem estar associados aos efeitos observados no presente estudo, visto que a clotianidina é um metabólito do tiametoxam.

Logo, a clotianidina em doses baixas, reduz a longevidade e possivelmente, causa pequenas alterações comportamentais nas abelhas, que podem ser dificilmente detectadas em campo e que aparecem após a emergência, evidenciando um efeito tardio frente a exposição larval, porém capazes de reduzir o número e o desempenho das abelhas operárias na colmeia, o que pode resultar numa rápida perda da população de abelhas operárias.

Assim como em outros estudos, as larvas de diferentes espécies de abelhas mostraram-se mais tolerantes ao neonicotinóide que na fase adulta (Nicholls et al., 2017; Tomé, Martins, Lima, Campos, & Guedes, 2012; Yang, Chang, Wu, & Chen, 2012), indicando que não houve eliminação e desintoxicação total desse composto na fase larval.

A maior tolerância das larvas ao inseticida pode ser resultante das diferenças nas intensidades de expressão das subunidades dos nAChRs entre a fase larval e a fase adulta, a qual começa a se intensificar no estágio pupal (Thany, Lenaers, Crozatier, Armengaud, & Gauthier, 2003), e a baixa quantidade de estruturas alvo no início do desenvolvimento larval, como as células de Kenyon que contém os receptores de acetilcolina (Yang et al., 2012). Portanto, com um número reduzido de sítios alvos na fase larval, o inseticida clotianidina em doses subletais apresenta toxicidade em fases mais tardias do desenvolvimento da abelha, após a sua emergência. Durante a fase de alimentação, a larva armazena os nutrientes para a metamorfose e a defecação ocorre somente no final do período de alimentação quando o intestino médio e posterior se conectam (Cruz-Ladim, 2009). Deste modo, os agrotóxicos absorvidos no intestino médio permanecem no organismo durante a fase larval, sendo mobilizados para os sítios-alvos durante a metamorfose, quando há remodelação tecidual, inclusive do cérebro.

Um agrotóxico hidrofílico, provavelmente fica circulando na hemolinfa e pode entrar em contato com os órgãos durante a fase larval, podendo ser mais facilmente excretado no final desta fase quando ocorre a defecação e a

liberação dos excretas pelos túbulos de Malpighi. Se o agrotóxico é hidrofóbico ou parcialmente hidrofóbico, como o inseticida clotianidina, solubilidade em água: 327 mg/L (20 °C) (Uneme, 2011) e o fungicida piraclostrobina, solubilidade em água: 1,9 mg/L (20 °C) (NCBI (National Center for Biotechnology Information), 2017), eles provavelmente acumulam no corpo gorduroso (Feng et al., 2017). Quando o corpo gorduroso mobiliza os nutrientes durante a metamorfose, para suprir as necessidades da pupa em fase de transformação, o composto químico que estava armazenado na larva atinge a hemolinfa e, nesse momento, as moléculas passam a exercer seus efeitos nos órgãos. No caso da clotianidina ela passará a atuar no cérebro a partir da fase pupal, o que comprometeria a morfofisiologia dos corpos pedunculados (Friol et al., 2017). Em relação ao fungicida, que não possui um órgão-alvo específico, pois pode interferir na produção de ATP das mitocôndrias de forma geral, o seu efeito pode ser diluído no organismo por sua ação sistêmica.

Adicionalmente, um estudo mostrou que a exposição das larvas à diferentes doses de tiametoxam, induziu a um aumento de atividade da acetilcolinesterase em pupas e abelhas recém-emergidas (Tavares et al., 2017), o que reforça a hipótese de ação do neonicotinóide somente a partir da

metamorfose, quando seria mobilizado e estaria presente na hemolinfa. Esses autores também observaram um aumento no nível de atividade das enzimas glutathiona-S-transferase (GST) e carboxilesterase na fase de pupa, indicando a ativação do processo de desintoxicação após a fase de exposição larval ao agrotóxico.

As abelhas adultas, em condições naturais, possuem uma quantidade menor de GST do que as pupas (Diao, Yuan, Liang, & Gao, 2006; Tavares et al., 2017). Como os neonicotinóides se ligam nos receptores de acetilcolina de forma estável, principalmente a partir da fase de pupa, provavelmente o efeito neurotóxico permanece na recém-emergida, que por sua vez, possui uma menor capacidade de desintoxicação pelas enzimas da fase II (ex., GST - glutathiona transferase) em relação à pupa. Isto pode explicar a diminuição da longevidade das abelhas expostas ou co-expostas à clotianidina na fase larval, em relação ao grupo controle.

O decréscimo na curva de sobrevivência das abelhas com exposição isolada ao inseticida foi mais acentuado do que nas abelhas que sofreram co-exposição. Quando em contato com organismos, os xenobióticos podem induzir o aumento dos gastos energéticos em atividades de desintoxicação (Rand et al., 2015). As principais enzimas envolvidas na biotransformação de

agrotóxicos nas abelhas são os citocromo monooxigenases P450, as glutathionas transferases, e carboxilesterases (Gong & Diao, 2017; Rand et al., 2015). Uma vez que os fungicidas do grupo estrobilurina atuam na inibição da respiração mitocondrial e consequente produção de ATP (Parreira, Neves, & Zambolim, 2010), sugerimos que a dose utilizada no presente estudo não foi suficiente para conduzir a redução da longevidade no grupo exposto ao fungicida isolado. No grupo co-exposto, a presença de dois agrotóxicos provavelmente induziu alta demanda energética necessária para a desintoxicação e, conseqüentemente, levou a uma redução mais sutil da longevidade em comparação com o inseticida isolado.

Na análise dos espectros e das moléculas químicas dos agrotóxicos não foi evidenciada uma possível reação dos dois agrotóxicos, mas é plausível que tenha ocorrido uma interação entre eles quando colocados em mistura. Uma segunda hipótese para os efeitos da co-exposição sobre a longevidade das abelhas, é que o fungicida em maior concentração possa ter interagido com as moléculas do inseticida de modo que a diluir o seu efeito neurotóxico. Assim, o número de moléculas do inseticida disponíveis para agir como antagonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina foi menor. Contudo, estudos adicionais

são necessários para compreender os mecanismos envolvidos que levaram a esse resultado biológico e se ocorreram alterações nas enzimas de desintoxicação pela presença do fungicida em adição ao inseticida.

Conclusões

A co-exposição ao inseticida clotianidina e ao fungicida piraclostrobina não mostrou um efeito aditivo ou sinérgico desses agrotóxicos em doses realísticas presentes nos recursos alimentares das larvas. O inseticida isolado e em combinação com o fungicida reduziu a longevidade das abelhas após a emergência, apesar desse efeito ter sido maior no inseticida isolado. O fungicida isoladamente não afetou o desenvolvimento das abelhas. Portanto, a exposição larval em doses baixas desses agrotóxicos podem prejudicar as colônias de abelhas pela diminuição do tempo de sobrevivência das operarias adultas.

Bibliografía

- Alkassab, A. T., & Kirchner, W. H. (2018). Assessment of acute sublethal effects of clothianidin on motor function of honeybee workers using video-tracking analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147(August 2017), 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.047>

- Berenbaum, M. R. (2016). Does the Honey Bee “Risk Cup” Runneth Over? Estimating Aggregate Exposures for Assessing Pesticide Risks to Honey Bees in Agroecosystems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(1), 13–20. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01067>
- Brandt, A., Gorenflo, A., Siede, R., Meixner, M., & Büchler, R. (2016). The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, 86, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.01.001>
- Budge, G. E., Garthwaite, D., Crowe, A., Boatman, N. D., Delaplane, K. S., Brown, M. A., ... Pietravalle, S. (2015). Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. *Scientific Reports*, 5(1), 12574. <https://doi.org/10.1038/srep12574>
- Byrne, F. J., Visscher, P. K., Leimkuehler, B., Fischer, D., Grafton-Cardwell, E. E., & Morse, J. G. (2014). Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. *Pest Management Science*, 70(3), 470–482. <https://doi.org/10.1002/ps.3596>
- Cruz-Ladim, C. (2009). *Abelhas: morfologia e funções de sistemas*. (UNESP, Ed.) (1st ed.). São Paulo.
- David, A., Botías, C., Abdul-Sada, A., Goulson, D., & Hill, E. M. (2015). Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(26), 8151–8162. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8986-6>
- Decourtye, A., & Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 683, 85–95.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J.-M. (2007). The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52(1), 81–106. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091440>
- Di Prisco, G., Cavaliere, V., Annoscia, D., Varricchio, P., Caprio, E., Nazzi, F., ... Pennacchio, F. (2013). Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

- 110(46), 18466–18471.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1314923110>
- Diao, Q., Yuan, K., Liang, P., & Gao, X. (2006). Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. *Journal of Apicultural Research*, 45(3), 145–152. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101333>
- Domingues, C. E. C., Abdalla, F. C., Balsamo, P. J., Pereira, B. V. R., Hausen, M. de A., Costa, M. J., & Silva-Zacarin, E. C. M. (2017). Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. *Chemosphere*, 186, 994–1005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.133>
- Feng, Y., Luthra, A., Ding, K., Yang, Y., Savage, J., Wei, X., ... Roberts, A. (2017). Mid-Infrared Spectroscopy Study of Effects of Neonicotinoids on Forager Honey Bee (*Apis mellifera*) Fat Bodies and Their Connection to Colony Collapse Disorder. *BioRxiv*, 205112. <https://doi.org/10.1101/205112>
- Fine, J. D., Cox-Foster, D. L., & Mullin, C. A. (2017). An inert pesticide adjuvant synergizes viral pathogenicity and mortality in honey bee larvae. *Scientific Reports*, 7(September 2016), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep40499>
- Fischer, J., Müller, T., Spatz, A.-K., Greggers, U., Grünewald, B., & Menzel, R. (2014). Neonicotinoids Interfere with Specific Components of Navigation in Honeybees. *PLoS ONE*, 9(3), e91364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091364>
- Fisher, N., & Meunier, B. (2008). Molecular basis of resistance to cytochrome *bc₁* inhibitors. *FEMS Yeast Research*, 8(2), 183–192. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00328.x>
- Friol, P. S., Catae, A. F., Tavares, D. A., Malaspina, O., & Roat, T. C. (2017). Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? *Chemosphere*, 185, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.113>
- Gong, Y., & Diao, Q. (2017). Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. *Ecotoxicology*, 26(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1742-7>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines

- driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957–1255957.
<https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, 41(3), 312–331.
<https://doi.org/10.1051/apido/2010018>
- Laurino, D., Porporato, M., Patetta, A., & Manino, A. (2011). Toxicity of neonicotinoid insecticides to honey bees: Laboratory tests. *Bulletin of Insectology*, 64(1), 107–113.
- Lee, K. V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M. E., Tarpy, D. R., Caron, D. M., ... Partnership, for the B. I. (2015). A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie*, 46(3), 292–305.
<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0356-z>
- Lopes, W. A., & Fascio, M. (2004). *Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho*. *Quim. Nova* (Vol. 27).
- Mao, W., Schuler, M. A., & Berenbaum, M. R. (2017). Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(10), 2538–2543.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1614864114>
- Menezes, C., Vollet-Neto, A., Marsaioli, A. J., Zampieri, D., Fontoura, I. C., Luchessi, A. D., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2015). A Brazilian social bee must cultivate fungus to survive. *Current Biology*, 25(21), 2851–2855.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.028>
- Mussen, E. C., Lopez, J. E., & Peng, C. Y. S. (2004). Effects of Selected Fungicides on Growth and Development of Larval Honey Bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Environmental Entomology*, 33(5), 1151–1154.
<https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.5.1151>
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2017). Pyraclostrobin | C19H18ClN3O4 - PubChem. Retrieved December 13, 2018, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6422843>
- Nicholls, E., Fowler, R., Niven, J. E., Gilbert, J. D., & Goulson, D. (2017). Larval exposure to field-realistic concentrations of clothianidin has no effect on development rate, over-winter survival or adult metabolic rate

- in a solitary bee, *Osmia bicornis*. *PeerJ*, 5, e3417. <https://doi.org/10.7717/peerj.3417>
- OECD. (2016). *Guidance Document on Honey Bee Larval Toxicity Test following Repeated Exposure Series on Testing & Assessment No. 239*. (OECD, Ed.).
- Parreira, D. F., Neves, W. dos S., & Zambolim, L. (2010). RESISTÊNCIA DE FUNGOS A FUNGICIDAS INIBIDORES DE QUINONA. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, 3(2), 1–11.
- Pires, C. S. S., Pereira, F. de M., Lopes, M. T. do R., Nocelli, R. C. F., Malaspina, O., Pettis, J. S., & Teixeira, É. W. (2016). Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?, 51(5), 422–442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>
- Pohorecka, K., Szczęśna, T., Witek, M., Mischczak, A., & Sikorski, P. (2017). The exposure of honey bees to pesticide residues in the hive environment with regard to winter colony losses. *Journal of Apicultural Science*, 61(1), 105–125. <https://doi.org/10.1515/JAS-2017-0013>
- Rand, E. E. D., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C. W. W., & Nicolson, S. W. (2015). Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Scientific Reports*, 5(January), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep11779>
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>
- Sánchez-Hernández, L., Hernández-Domínguez, D., Martín, M. T., Nozal, M. J., Higes, M., & Bernal Yagüe, J. L. (2016). Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. *Journal of Chromatography A*, 1428, 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.066>
- Schmuck, R., & Lewis, G. (2016). Review of field and monitoring studies investigating the role of nitro-substituted neonicotinoid insecticides in the reported losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). *Ecotoxicology*, 25(9), 1617–1629. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1734-7>
- Silverstein, R., Webster, F., & Kiemle, D. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds* (7th ed.).
- Simon-Delso, N., Martin, G. S., Bruneau, E., Minsart, L. A., Mouret, C., & Hautier, L. (2014). Honeybee colony

- disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. *PLoS ONE*, *9*(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103073>
- Simon-Delso, N., San Martin, G., Bruneau, E., Hautier, L., & Medrzycki, P. (2017). Toxicity assessment on honey bee larvae of a repeated exposition of a systemic fungicide, boscalid. *Bulletin of Insectology*, *70*(1), 83–90.
- Tavares, D. A., Dussaubat, C., Kretzschmar, A., Carvalho, S. M., Silva-Zacarin, E. C. M., Malaspina, O., ... Belzunces, L. P. (2017). Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. *Environmental Pollution*, *229*, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.092>
- Tavares, D. A., Roat, T. C., Carvalho, S. M., Silva-Zacarin, E. C. M., & Malaspina, O. (2015). In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, *135*, 370–378. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.090>
- Thany, S. H., Lenaers, G., Crozatier, M., Armengaud, C., & Gauthier, M. (2003). Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, *12*(3), 255–262.
- Thompson, H., & Wilkins, S. (2003). Assessment of the synergy and repellency of pyrethroid / fungicide mixtures. *Bulletin of Insectology*, *56*(1), 131–134.
- Tomé, H. V. V., Martins, G. F., Lima, M. A. P., Campos, L. A. O., & Guedes, R. N. C. (2012). Imidacloprid-Induced Impairment of Mushroom Bodies and Behavior of the Native Stingless Bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE*, *7*(6), e38406. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038406>
- Uneme, H. (2011). Chemistry of Clothianidin and Related Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(7), 2932–2937. <https://doi.org/10.1021/jf1024938>
- Wessler, I., Gärtner, H.-A., Michel-Schmidt, R., Brochhausen, C., Schmitz, L., Anspach, L., ... Kirkpatrick, C. J. (2016). Honeybees Produce Millimolar Concentrations of Non-Neuronal Acetylcholine for Breeding: Possible Adverse Effects of Neonicotinoids. *PLOS ONE*, *11*(6), e0156886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156886>

- Williamson, S. M., Willis, S. J., & Wright, G. A. (2014). Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. *Ecotoxicology*, 23(8), 1409–1418. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1283-x>
- Yang, E. C., Chang, H. C., Wu, W. Y., & Chen, Y. W. (2012). Impaired Olfactory Associative Behavior of Honeybee Workers Due to Contamination of Imidacloprid in the Larval Stage. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049472>
- Zhu, W., Schmehl, D. R., Mullin, C. A., & Frazier, J. L. (2014). Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547>

Agradecimientos

Ao graduando em química Samir Leite Mathias pelo suporte no uso do equipamento infravermelho e ao Apicultor Edson Sampaio do Apiário Bico Doce pelo fornecimento das larvas de abelhas.

Financiamento

Fapesp nº 2016/26043-6