

**FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**TOXICIDADE DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS PARA AS
ABELHAS SEM FERRÃO *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca
fiebrigi***

Andressa Linhares Dorneles

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 – Caixa Postal 1429
Fone (51) 3320-3500 - Fax (51) 3339-1564
90619-900 Porto Alegre – RS
Brasil
2015**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

TOXICIDADE DE INSETICIDAS ORGANOFOSFORADOS PARA AS
ABELHAS SEM FERRÃO *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca*
fiebrigi

Andressa Linhares Dorneles
Orientador: Dra. Betina Blochtein

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE – RS

2015

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
APRESENTAÇÃO	9
MANUSCRITO CIENTÍFICO	10
Toxicidade de inseticidas organofosforados para as abelhas sem ferrão <i>Scaptotrigona bipunctata</i> e <i>Tetragonisca fiebrigi</i>	10
Abstract.....	12
Introdução	13
Material e Métodos	15
Resultados.....	22
Discussão	28
Agradecimentos	37
Referências.....	37
ANEXOS	51
Normas de Publicação Periódico PLoS ONE	51

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Colméias de abelhas sem ferrão dispostas no meliponário da PUCRS.	16
Figura 2. Entrada das colônias. <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (a) e <i>Scaptotrigona bipunctata</i> (b).	17
Figura 3. Estruturas para a contenção de abelhas forrageiras mantidas em câmaras de criação para os testes de toxicidade. Caixas de madeira telada utilizadas no teste oral, com alimentador acoplado contendo solução de sacarose com adição de inseticida em diferentes concentrações (a), placas de Petri utilizadas no teste tópico agudo (b).	18
Figura 4. Toxicidade oral aguda (48 horas) do inseticida clorpirifós para abelhas forrageiras de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> (a) e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (b).	23
Figura 5. Toxicidade oral aguda (48 horas) do inseticida fosmete para abelhas forrageiras de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> (a) e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (b).	24
Figura 6. Toxicidade tópica aguda (48 horas) do inseticida clorpirifós para abelhas forrageiras de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> (a) e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (b).	26
Figura 7. Toxicidade tópica aguda (48 horas) do inseticida fosmete para abelhas forrageiras de <i>Scaptotrigona bipunctata</i> (a) e <i>Tetragonisca fiebrigi</i> (b).	27

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Toxicidade oral aguda de inseticidas para abelhas forrageiras de *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi*. 25

Tabela 2. Toxicidade tópica aguda de inseticidas para abelhas forrageiras de *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi*..... 28

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais esta etapa realizada.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores do PPG em Zoologia, pelos ensinamentos.

Em especial à professora Dra Guendalina Turcato Oliveira, pelo carinho e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

À minha orientadora, professora Dra Betina Blochtein, por me dar a oportunidade de trabalhar em uma nova linha de pesquisa. Agradeço pela confiança, orientação e carinho.

Aos colegas de Laboratório de Entomologia – Ecologia de Abelhas, pelos bons momentos de convívio, apoio e conversas científicas.

À minha amiga Mariana Zaniol Fernandes, pelo companheirismo, discussões científicas e por toda ajuda durante a revisão do projeto.

Ao meu colega Dr. Charles Fernando dos Santos, pelas dicas de estatística.

À Dra. Annelise de Souza Rosa, pelo incentivo e ajuda, sua parceria foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

À Dra. Kátia Matiotti, provavelmente sem sua indicação eu não teria retornado a vida acadêmica.

Ao professor Luiz Ernani Aguiar Silva, pelo apoio.

Ao professor Dr. Alexandre Arenzon, pela ajuda em ecotoxicologia.

À professora Eliane Maria Machado, pela revisão da dissertação.

À minha família e aos meus amigos, pelo carinho, apoio e incentivo.

Ao meu noivo Marcio da Silva Silva, pelo amor, companheirismo e paciência, principalmente em meus momentos de crise. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por compreender minha ausência.

E a todos aqueles que não foram citados aqui, mas direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho, muito obrigada!

RESUMO

O atual declínio global de populações de abelhas tem sido atribuído principalmente à utilização excessiva de agrotóxicos. A maioria das pesquisas acerca dos riscos de inseticidas para abelhas têm como foco de estudo *Apis mellifera*. No entanto, devido à grande diversidade de abelhas sem ferrão no Brasil, estudos que avaliam os riscos a espécies nativas se tornam necessários e relevantes. No País, a importância dos serviços de polinização prestados por abelhas é reconhecida em culturas de interesse econômico a exemplo de algodão, café, laranja, maçã e soja. Nesses cultivos empregam-se muitos inseticidas para o controle de pragas, se destacando o uso de organofosforados, tais como clorpirifós (Lorsban®) e fosmete (Imidan®). Em virtude da utilização em grande escala de agrotóxicos em culturas que ofertam flores atrativas para abelhas no Brasil, o objetivo deste estudo foi determinar a concentração letal média (CL₅₀), via exposição oral, e a dose letal média (DL₅₀), pela aplicação tópica, desses inseticidas para as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi*. Nos testes de toxicidade oral aguda foram utilizadas cinco concentrações diluídas em solução de sacarose e ofertadas mediante dieta para as abelhas. Nos testes de toxicidade tópica aguda foram utilizadas cinco doses diluídas em acetona, sendo aplicado 1 µL de cada dose no pronoto das abelhas. Em ambos os testes a mortalidade foi registrada após 48 horas de exposição. No teste oral os valores de CL₅₀ de clorpirifós foram de 0,0112 µg i.a./µL dieta para *S. bipunctata* e de 0,0018 µg i.a./µL dieta para *T. fiebrigi*. A CL₅₀ de fosmete para *S. bipunctata* foi de 0,0245 µg i.a./µL dieta e para *T. fiebrigi* 0,0236 µg i.a./µL dieta. No teste tópico, a DL₅₀ de clorpirifós foi de 0,0110 µg i.a./abelha para *S. bipunctata* e de 0,0033 µg i.a./abelha para *T. fiebrigi*. A DL₅₀ de fosmete para *S. bipunctata* foi de 0,0087 µg i.a./abelha e para *T. fiebrigi* foi 0,0083 µg i.a./abelha. Houve diferença significativa na suscetibilidade entre as abelhas avaliadas, indicando que as forrageiras *S. bipunctata* foram mais tolerantes ao inseticida clorpirifós do que a *T. fiebrigi*, por via tópica e oral. Essas diferenças de suscetibilidade podem estar associadas ao peso corporal da abelha, ou seja, *S. bipunctata* espécie com maior peso (18,28 mg) foi mais tolerante que *T. fiebrigi* com menor peso (4,36 mg). Além disso características determinadas geneticamente como a composição química da cutícula podem facilitar a penetração do inseticida no corpo da abelha, aumentando a suscetibilidade de cada espécie. Outra característica está relacionada à capacidade para detoxicação, pois a ação de várias enzimas detoxificadoras presentes no sistema digestório das abelhas podem reduzir a toxicidade dos produtos. Em contrapartida, a suscetibilidade entre as duas espécies de abelhas não apresentou diferenças significativas em relação ao inseticida fosmete, fato que poderíamos inferir, estar associado à maior capacidade de metabolização e eliminação deste produto pelas abelhas. Comparando-se os valores de DL₅₀ obtidos no presente estudo com os dados da literatura estabelecidos para *A. mellifera* (clorpirifós 0,11 µg/abelha; fosmete 1,13 µg/abelha), podemos concluir que as abelhas nativas são mais sensíveis aos inseticidas clorpirifós e fosmete. Esta evidência ressalta a importância de incluir outras espécies de abelhas nos testes de toxicidade exigidos para a autorização de uso de agrotóxicos, a fim de garantir a proteção das abelhas nativas. Os resultados obtidos neste estudo indicam que os inseticidas clorpirifós (Lorsban®) e fosmete (Imidan®) são potencialmente perigosos para *S. bipunctata* e *T. fiebrigi*, tanto por via tópica como pela ingestão. Dessa maneira, é fundamental a proposição de medidas para minimizar o impacto sobre os polinizadores. Este estudo representa a primeira avaliação dos efeitos letais dos inseticidas clorpirifós e fosmete para *S. bipunctata* e *T. fiebrigi*, fornecendo importantes subsídios para a continuidade de estudos acerca de toxicidade de agrotóxicos em abelhas sem ferrão.

ABSTRACT

TOXICITY OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES TO STINGLESS BEES *Scaptotrigona bipunctata* AND *Tetragonisca fiebrigi*

The current bee populations decline has been mainly attributed to the excessive use of pesticides. The most of researches about risks of pesticides to bees are focused on honeybee *Apis mellifera*. However, due to the wide diversity of stingless bees in Brazil, studies evaluating the risks to native species become necessary and relevant. In Brazil, the importance of pollination services provided by bees is recognized in economic interest crops such as apple, coffee, cotton, orange, and soybeans. In these crops, many insecticides are used for pest control, especially organophosphates such as chlorpyrifos (Lorsban®) and phosmet (Imidan®). Due to the large use of pesticides on crops that offer attractive flowers for bees in Brazil, the aim of this study was to determine the lethal concentration (LC₅₀), via oral exposure, and the lethal dose (LD₅₀) for topically applied of these insecticides to stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi*. In acute oral toxicity tests, five concentrations dilute in sucrose solution were offered to the bees through the food. In acute topical toxicity tests, 1µL of each one of the five doses diluted in acetone were applied topically on bees. After 48 hours of exposure, the number of dead bees was recorded. In the oral assay, the LC₅₀ values of chlorpyrifos was 0,0112 µg a.i./µL diet to *S. bipunctata* and 0,0018 µg a.i./µL diet to *T. fiebrigi*. The LC₅₀ values of phosmet was 0,0245 µg a.i./µL diet to *S. bipunctata* and 0,0236 µg a.i./µL diet to *T. fiebrigi*. In the topic application assay, the LD₅₀ of chlorpyrifos was 0,0110 µg a.i./bee to *S. bipunctata* and 0,0033 µg a.i./bee to *T. fiebrigi*. The LD₅₀ of phosmet was 0,0087 µg a.i./bee to *S. bipunctata* and 0,0083 µg a.i./bee to *T. fiebrigi*. According to the results, there was significant difference in susceptibility between the stingless bees species tested, indicating that forager workers of *S. bipunctata* were more tolerant to the insecticide chlorpyrifos than *T. fiebrigi*, in both assays. These differences in susceptibility may be related to the body weight of the bees, i.e., *S. bipunctata* species with the highest weight (18.28 mg) would be more tolerant than *T. fiebrigi*, with the lowest weight (4.36 mg). In addition, characteristics genetically determined, as the chemical composition of the cuticle, may facilitate penetration of the insecticide into the bee's body, increasing the susceptibility of each species. Another point is related to detoxification capacity of the bees, by the action of detoxifying enzymes present in its digestive system. In contrast, the susceptibility between the two stingless bees species showed no significant differences regarding the insecticide phosmet, an event that could be associated with the ability of these bees metabolize and remove this product. Comparing the LD₅₀ values obtained in this study with literature data established for *A. mellifera* (chlorpyrifos 0.11 µg/bee; phosmet 1.13 µg/bee), we concluded that native bees are more sensitive to the insecticides chlorpyrifos and phosmet. This evidence emphasizes the importance of including other species of bees in toxicity assays required for the authorization of the use of pesticides, in order to ensure the protection of native bees. Our results indicate that the insecticides chlorpyrifos (Lorsban®) and phosmet (Imidan®) are potentially dangerous to *S. bipunctata* and *T. fiebrigi* species, both topically and by ingestion. Thus, it is essential to propose measures to minimize the impact on pollinators. This study is the first evaluation of the lethal effects of the insecticides chlorpyrifos and phosmet to *S. bipunctata* and *T. fiebrigi*, providing important subsidies for future studies on pesticide toxicity in stingless bees.

APRESENTAÇÃO

A produção agrícola mundial está cada vez mais dependente do uso de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças, a fim de assegurar a produtividade almejada. Neste cenário o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos. O uso indiscriminado desses produtos vem preocupando especialistas em relação a perda de polinizadores e a sustentabilidade dos serviços de polinização.

No Brasil, os serviços de polinização são importantes para muitas culturas de interesse econômico, a exemplo do algodão, café, citros, maçã e soja. Entretanto, nessas culturas uma vasta gama de agrotóxicos é utilizada, onde se destacam os inseticidas organofosforados, que apresentam amplo espectro de ação e alta toxicidade podendo afetar a fauna de abelhas.

Avaliações em laboratório do efeito letal de inseticidas para insetos não-alvo podem ser feitas por meio de testes de toxicidade aguda. A metodologia padrão para estimar o efeito letal de um inseticida é através da determinação da concentração letal média (CL₅₀) ou da dose letal média (DL₅₀), as quais provocam a morte de 50% da população testada. Nesses testes, os inseticidas são administrados oralmente ou por via tópica e a mortalidade é registrada 24 e/ou 48 horas após a exposição. *Apis mellifera* é a espécie mais utilizada para avaliações de toxicidade. Porém, devido à alta diversidade de abelhas no Brasil e ao risco de exposição aos agrotóxicos, as espécies nativas também devem ser incluídas nesses estudos.

Tendo em vista a importância do serviço de polinização prestado pelas abelhas e a ampla utilização de inseticidas no Brasil, o presente estudo avalia a resposta de toxicidade dos inseticidas organofosforados clorpirifós (Lorsban®) e fosmete (Imidan®) para as abelhas nativas *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi*. Essas duas espécies de abelhas apresentam ampla distribuição geográfica e podem ser manejadas comercialmente para fins de produção de mel e polinização agrícola.

A partir dos resultados desse estudo foi produzido um manuscrito científico que está estruturado de acordo com as normas estabelecidas pela revista PLoS ONE.

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Toxicidade de inseticidas organofosforados para as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi*

Andressa Linhares Dorneles, Annelise de Souza Rosa e Betina Blochtein

(Posteriormente será feita a tradução para o inglês)

1 Toxicity of organophosphorus pesticides to stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and
2 *Tetragonisca fiebrigi*
3 Andressa Linhares Dorneles^{1*}, Annelise de Souza Rosa² e Betina Blochtein¹
4 ¹Laboratório de Entomologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade
5 Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
6 ²Departamento de Entomologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo,
7 Brasil.
8 *Corresponding author
9 E-mail: aldorneles@hotmail.com (ALD)
10 Short title: Insecticide toxicity to stingless bees

11 **Abstract**

12 The toxicity of insecticides chlorpyrifos (Lorsban[®]) and phosmet (Imidan[®]), often used
13 in economic interest crops such as apple, coffee, cotton, orange, and soybeans, was
14 estimated to foragers of stingless bees species *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca*
15 *fiebrigi*. We determined the lethal concentration (LC₅₀), via oral exposure, and the lethal
16 dose (LD₅₀) for topically applied of these insecticides. The results showed significant
17 difference in susceptibility between the species tested, indicating that forager workers of
18 *S. bipunctata* were more tolerant to the insecticide chlorpyrifos than *T. fiebrigi*, in both
19 assays. These differences may be related to the body weight of the bees, i.e., *S. bipunctata*
20 species with the highest weight (18.28 mg) would be more tolerant than *T. fiebrigi*, with
21 the lowest weight (4.36 mg). In addition, genetic characteristics, as the chemical
22 composition of the cuticle, may facilitate penetration of the insecticide into the bee's body,
23 increasing the susceptibility of each species. Another point is related to detoxification
24 capacity of the bees, by the action of detoxifying enzymes present in its digestive system.
25 In contrast, the susceptibility between the two stingless bees species showed no
26 significant differences regarding the insecticide phosmet, an event that could be
27 associated with the ability of these bees metabolize and remove this product. Comparing
28 the LD₅₀ values obtained in this study with data established for *Apis mellifera*
29 (chlorpyrifos 0.11 µg/bee; phosmet 1.13 µg/bee), we concluded that native bees are more
30 sensitive to these insecticides. This evidence emphasizes the importance of including
31 other bees species in toxicity assays, required for pesticides use authorization, in order to
32 ensure the protection of native bees. Our results indicate that the insecticides chlorpyrifos
33 and phosmet are potentially dangerous to *S. bipunctata* and *T. fiebrigi* species, both

34 topically and by ingestion. Thus, it is essential to propose measures to minimize the
35 impact on pollinators.

36

37 **Introdução**

38 A polinização é um serviço ambiental essencial para a manutenção dos
39 ecossistemas naturais [1] e para a sustentabilidade da agricultura [2]. Na natureza cerca
40 de 85% das espécies de angiospermas são polinizadas por animais, principalmente insetos
41 [3,4]. Dentre esses, as abelhas são consideradas os agentes polinizadores mais eficientes
42 [5-7], responsáveis pela polinização de aproximadamente 70% das espécies cultivadas
43 mundialmente [2,8].

44 O atual declínio na diversidade e abundância de polinizadores é motivo de
45 preocupação [9,10] em relação à sustentabilidade dos serviços de polinização [7,11-13].
46 Níveis insatisfatórios desse serviço comprometem a capacidade reprodutiva das plantas
47 nativas [14] e a produção agrícola mundial [6,13, 15].

48 Fatores como a fragmentação de habitats, redução da vegetação nativa [11,12,16]
49 e mudanças climáticas vêm contribuindo para a redução das populações de abelhas [7].
50 Entretanto, o uso não sustentável dos agroecossistemas [13,15,16] e a utilização excessiva
51 de agrotóxicos são consideradas as principais causas da perda de diversidade desses
52 insetos [12,15-18].

53 Nesse contexto, a aplicação de agrotóxicos em culturas agrícolas que ofertam
54 flores atrativas para abelhas se torna um relevante ponto a ser considerado em estudos de
55 avaliação de risco a estes polinizadores. No Brasil, a importância dos serviços de
56 polinização prestado pelas abelhas é reconhecida em culturas de interesse econômico, a
57 exemplo de algodão, café, laranja, maçã e soja [19]. De acordo com Klein et al. [6] os

58 cultivos de algodão, café e soja são classificados como moderadamente dependentes de
59 polinização, com índices que variam entre 10 a 40%. A cultura de laranja é considerada
60 de baixa dependência do serviço de polinização, com índices de até 10%. Embora estas
61 culturas não dependam obrigatoriamente de polinizadores, a presença de abelhas
62 beneficia a produção de grãos, a qualidade dos frutos e o aumento da produtividade [20-
63 23].

64 Um exemplo representativo é a produção de maçã, classificada como altamente
65 dependente de polinização entomófila (de 40 a 90%) [24,25], na qual o déficit de
66 polinização resulta em frutos de baixa qualidade [26] e menor produtividade [8]. Diante
67 dessa dependência de polinizadores, muitos produtores utilizam colônias de *Apis*
68 *mellifera* L. em pomares de maçã [19,24,27]. Porém, abelhas nativas também são
69 consideradas visitantes florais e eficazes polinizadores [25,28-30].

70 Na produção desses cultivos aplica-se uma vasta gama de agrotóxicos para o
71 controle de doenças e pragas [15,31]. Nesse contexto, se destaca o uso de agrotóxicos
72 organofosforados, os quais apresentam amplo espectro de ação e alta toxicidade [32],
73 podendo afetar a fauna de abelhas [3,17,33].

74 Entre os diversos representantes do grupo químico de organofosforados, os
75 inseticidas clorpirifós e fosmete são amplamente empregados nessas culturas. Esses
76 produtos possuem amplo espectro de ação [34,35], e são considerados altamente tóxicos
77 e danosos ao meio ambiente [36], o que inclui insetos não alvo [34,37]. São inseticidas
78 de ação neurotóxica [34], inibindo a acetilcolinesterase, enzima que atua no mecanismo
79 de transmissão de impulsos nervosos [38].

80 Em estudos de toxicidade em insetos não alvo, *A. mellifera* é a espécie utilizada
81 como principal modelo experimental devido à sua importância reconhecida como

82 polinizadora global [39,40]. No entanto, sabe-se que a suscetibilidade das abelhas a
83 determinado inseticida pode diferir de uma espécie para outra [37]. Dessa forma, a
84 avaliação de toxicidade de agrotóxicos em outros grupos de abelhas deve ser considerada.
85 As abelhas sem ferrão, pertencentes à tribo Meliponini, embora possuam características
86 biológicas favoráveis à polinização aplicada [11,41,42] e venham gradativamente sendo
87 valorizadas como alternativa para a polinização comercial, nas regiões tropicais e
88 subtropicais [43], pouco tem sido avaliadas quanto à toxicidade dos agrotóxicos [40,44-
89 48].

90 Entre os meliponíneos, *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier) e *Tetragonisca*
91 *fiebrigi* (Schwarz) estão entre as espécies mais criadas em três biomas brasileiros (Pampa,
92 Mata Atlântica e Pantanal) [42]. *Scaptotrigona bipunctata*, conhecida popularmente
93 como tubuna, é encontrada na Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru [49], onde constitui ninhos
94 populosos com grande capacidade para produção de mel [42,50]. *Tetragonisca fiebrigi*,
95 conhecida por jataí tem ocorrência em parte da Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai [49],
96 é de fácil manejo [51] e considerada excelente produtora de mel [42,50].

97 Em virtude da vasta utilização de inseticidas organofosforados em cultivos que
98 ofertam flores atrativas para abelhas no Brasil e, portanto, apresentam risco a organismos
99 não alvo, e da ampla distribuição geográfica de *S. bipunctata* e *T. fiebrigi*, o presente
100 trabalho teve como objetivo determinar a concentração letal média (CL₅₀), via exposição
101 oral, e a dose letal média (DL₅₀), via exposição tópica, dos inseticidas clorpirifós e
102 fosmete para abelhas forrageiras de *S. bipunctata* e *T. fiebrigi*.

103 **Material e Métodos**

104 **Obtenção e Manutenção das Abelhas**

105 As abelhas utilizadas nesse estudo foram obtidas a partir de colônias de *S.*
106 *bipunctata* e de *T. fiebrigi*, provenientes do meliponário da Pontifícia Universidade
107 Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil) (Fig. 1).

108



109

110 **Figura 1. Colméias de abelhas sem ferrão dispostas no meliponário da PUCRS.**

111

112 Para cada exposição (dose/concentração) e seus respectivos controles foram
113 utilizadas 60 abelhas por espécie. Nos testes com *S. bipunctata* para cada exposição foram
114 feitas cinco réplicas, cada uma contendo 12 abelhas. Para *T. fiebrigi* cada exposição teve
115 três réplicas, cada uma contendo 20 abelhas. A distribuição da quantidade de abelhas em
116 cada caixa foi determinada considerando-se o tamanho e o comportamento dos indivíduos
117 das duas espécies. A fim de garantir a variabilidade genética e obter estimativas

118 toxicológicas mais confiáveis, cada replica foi composta por abelhas de diferentes
119 colônias.

120 As abelhas foram coletadas junto à entrada das colônias (Figs. 2a e 2b) e em
121 seguida transferidas para caixas de madeira (9,5 x 11,5 x 2,5 cm) telada para realização
122 dos testes orais. Para os testes tópicos as abelhas foram transferidas para placas de Petri
123 (150 x 15 mm) forradas com papel filtro.

124



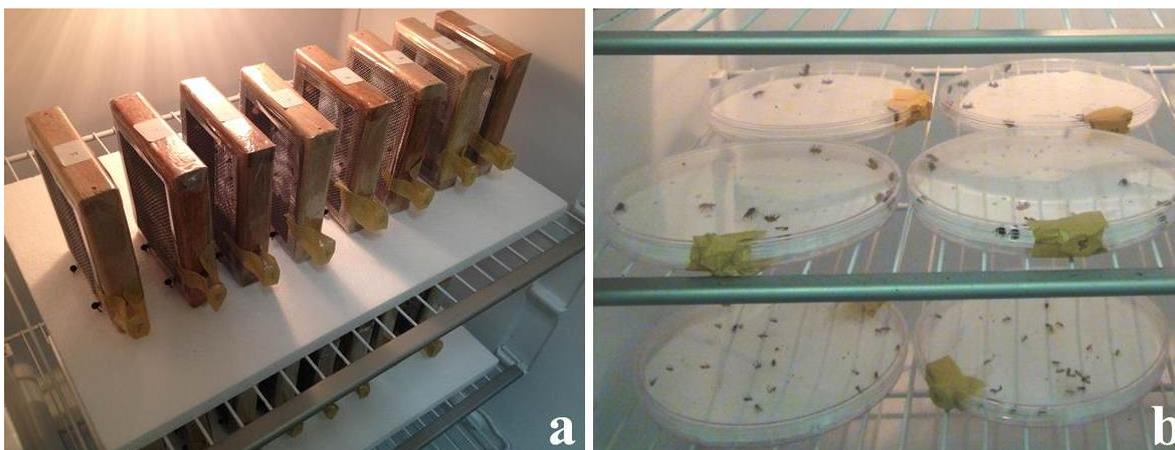
125

126 **Figura 2. Entrada das colônias. *Tetragonisca fiebrigi* (a) e *Scaptotrigona bipunctata***
127 **(b).**

128

129 A fim de minimizar o estresse ocasionado pelo confinamento, previamente ao
130 início dos testes, as abelhas permaneceram em adaptação por 24 horas, sendo alimentadas
131 com solução de sacarose (água e açúcar 1:1) sem inseticida. Durante o período de
132 adaptação e de experimento, as abelhas foram mantidas em câmaras de criação com
133 temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $70 \pm 2\%$, com ausência de luminosidade
134 (Figs. 3a e 3b).

135



136

137 **Figura 3. Estruturas para contenção de abelhas forrageiras mantidas em câmaras**
138 **de criação durante a realização dos testes de toxicidade. Caixas de madeira telada**
139 **utilizadas no teste oral, com alimentador acoplado contendo solução de sacarose com**
140 **adição de inseticida em diferentes concentrações (a), placas de Petri utilizadas no**
141 **teste tópico agudo (b).**

142

143 **Inseticidas**

144 Os produtos selecionados para este estudo são formulações comerciais de dois
145 inseticidas organofosforados, ambos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e
146 Abastecimento [52]:

147 (1) clorpirifós (0,0-diethyl-0-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate) - Lorsban®
148 480BR, Dow AgroSciences, 48% ingrediente ativo (i.a.). Classificação toxicológica I
149 (extremamente tóxico) e classificação do potencial de periculosidade ambiental II
150 (produto muito perigoso ao meio ambiente). Registrado para uso em diversas culturas,
151 entre estas o algodão, café, citros, maçã e soja. Utilizamos como referência a dose
152 recomendada para aplicação nos pomares de maçã de 100-150 mL/100 L de calda (0,48-

153 0,72 µg i.a./µL calda), pois essa cultura é classificada como altamente dependente de
154 polinização.

155 (2) fosmete (0,0-dimethyl S-phthalimidomethyl phosphorodithioate) - Imidan[®] 500wp,
156 Cross Link, 50% i.a. Classificação toxicológica I (extremamente tóxico) e classificação
157 do potencial de periculosidade ambiental III (produto perigoso ao meio ambiente).
158 Registrado para uso em citros, maçã e pêssigo. Dose recomendada para uso na maçã de
159 150-200 g/100 L água (0,75-1,00 µg i.a./µL água).

160

161 **Testes de Toxicidade**

162 A suscetibilidade das abelhas forrageiras aos inseticidas foi avaliada usando dois
163 meios de exposição: ingestão e tópico. A fim de determinar as concentrações apropriadas
164 para o teste definitivo foram realizados testes preliminares com cinco diluições em série
165 de fator 10 da solução estoque (1µg i.a./µL de água destilada). A partir do conhecimento
166 das concentrações onde houve respostas, foram estabelecidas cinco concentrações
167 espaçadas de tal forma a compreender o intervalo de 1 a 100% de mortalidade. Para
168 determinar a concentração letal média (CL₅₀) e a dose letal média (DL₅₀), a taxa de
169 mortalidade foi registrada após 48 horas de exposição dos indivíduos aos inseticidas [53].
170 Foram consideradas mortas as abelhas que permaneceram imóveis por mais de 10
171 segundos [54].

172

173 **Teste oral agudo**

174 Os testes para determinação da CL₅₀ via oral foram realizados de acordo com as
175 diretrizes internacionais para estudos de risco de pesticidas agrícolas publicadas pela

176 International Bee Research Association [53] e Organisation for Economic Co-operation
177 and Development [55].

178 Para a realização dos testes de toxicidade oral aguda a solução estoque foi diluída
179 em solução de sacarose (água e açúcar 1:1), para atingir as cinco concentrações a serem
180 oferecidas às abelhas. O alimento com adição de inseticida foi ofertado às abelhas através
181 de tubo plástico (1,5 mL) perfurado em uma das extremidades e acoplado às caixas. As
182 concentrações de clorpirifós utilizadas compreenderam o intervalo de 0,0025 – 0,0400 µg
183 i.a./µL dieta para *S. bipunctata* e de 0,0010 – 0,0050 µg i.a./µL dieta para *T. fiebrigi*. As
184 concentrações de fosmete foram avaliadas de 0,0050 – 0,1000 µg i.a./µL dieta para *S.*
185 *bipunctata* e de 0,0050 – 0,0667 µg i.a./µL dieta para *T. fiebrigi*. O grupo controle recebeu
186 solução de sacarose sem adição de inseticida.

187 Para induzir o consumo do alimento oferecido às abelhas, os indivíduos foram
188 privados de alimentação por um período de 2 horas antes do início dos experimentos.
189 Após o período de jejum cada grupo de abelhas recebeu 100 µL de alimento. Após seis
190 horas de oferta de alimento, o alimentador foi substituído por um novo, contendo apenas
191 solução de sacarose. A quantidade de alimento consumida foi obtida através da pesagem
192 do alimentador no início e após a exposição.

193

194 **Teste tópico agudo**

195 Os testes para determinação da DL₅₀ por exposição tópica também foram
196 realizados de acordo com as diretrizes internacionais para estudos de risco de pesticidas
197 agrícolas publicadas pela International Bee Research Association [53] e Organisation for
198 Economic Co-operation and Development [56].

199 Para realização do teste de toxicidade tópica aguda, a solução estoque foi diluída
200 em acetona para atingir as cinco doses a serem aplicadas de 0,0025 – 0,0400 µg i.a./abelha
201 e de 0,0013 – 0,0100 µg i.a./abelha do inseticida clorpirifós para *S. bipunctata* e *T. fiebrigi*
202 respectivamente. Quanto ao inseticida fosmete, as doses aplicadas para ambas as espécies
203 foram de 0,0025 – 0,0400 µg i.a./abelha. A utilização de acetona é indicada por ser um
204 solvente orgânico de baixa toxicidade para as abelhas [53].

205 Previamente à aplicação tópica das doses, as abelhas foram anestesiadas a -8°C
206 por 2 minutos. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta foi aplicado 1µL de cada
207 dose na região do pronoto de cada abelha. Foram utilizados dois grupos de controle. O
208 grupo controle do solvente, onde foi aplicado somente acetona e um grupo controle que
209 não recebeu nenhuma aplicação. Após a aplicação das doses, as abelhas foram mantidas
210 em câmara de criação, sendo fornecido alimento (solução de sacarose a 50%) *ad libitum*.

211

212 **Análises Estatísticas**

213 A normalidade dos dados de mortalidade e consumo de alimento foram
214 verificadas através do teste de Shapiro-Wilk do programa estatístico SPSS 17.0.

215 Ambos os valores de CL₅₀ e DL₅₀, bem como o seu respectivo intervalo de
216 confiança de 95% e valores qui-quadrado foram determinados empregando-se a função
217 *two-parameter log-logistic* do pacote “drc” –*Analysis of Dose-Response Curves* [57],
218 compilado pelo programa R® (2015). Quando os dados se mostraram não paramétricos,
219 optou-se pela utilização de Trimmed Spearman Karber [58].

220 Após a obtenção das CL₅₀ e DL₅₀, foi possível avaliar a toxicidade dos inseticidas
221 sob dois aspectos: (I) comparando os valores de CL₅₀ ou DL₅₀ de cada inseticida entre as
222 espécies de abelhas e; (II) comparando os valores das CL₅₀ ou DL₅₀ entre os inseticidas

223 para cada espécie de abelha. Para tanto, em ambos os casos foram utilizados os valores
224 dos intervalos de confiança de CL_{50} e DL_{50} , sendo considerados significativamente
225 diferentes quando não houve sobreposição desses intervalos, a 95% de probabilidade.

226 A fim de comparar se houve diferença no consumo do alimento tratado com
227 inseticida, durante a exposição por via oral, utilizou-se ANOVA *OneWay* com Tukey *post*
228 *hoc*, através do programa estatístico SPSS 17.0.

229 Os resultados dos testes de controle do solvente (acetona) foram submetidos a
230 análise estatística, através do teste de qui-quadrado, para avaliar a toxicidade da acetona
231 para as forrageiras de *S. bipunctata* e *T. fiebrigi*.

232

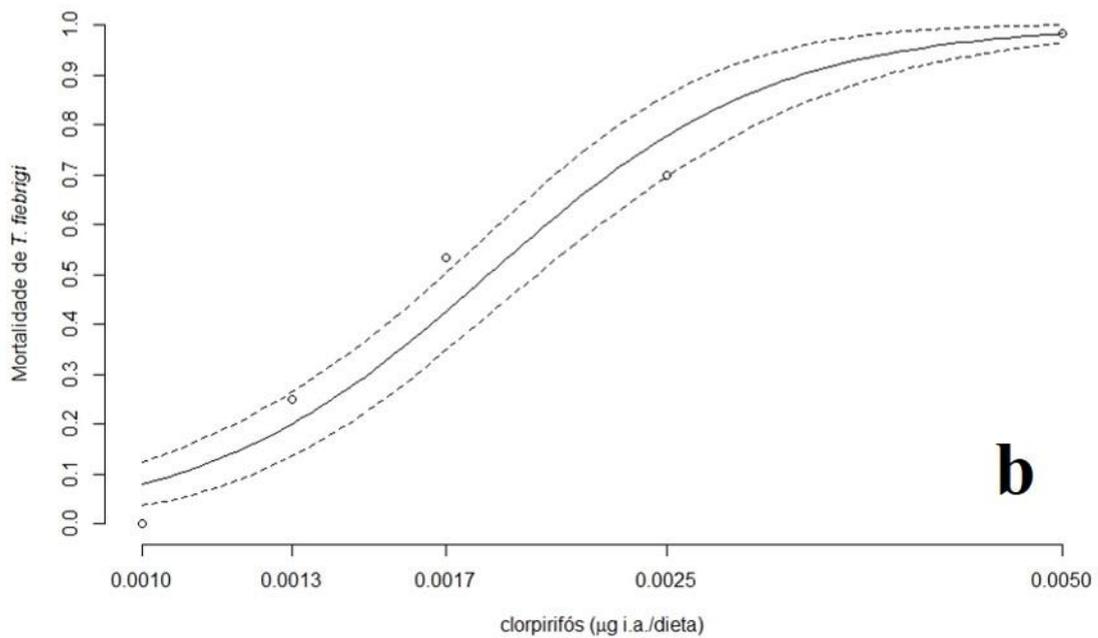
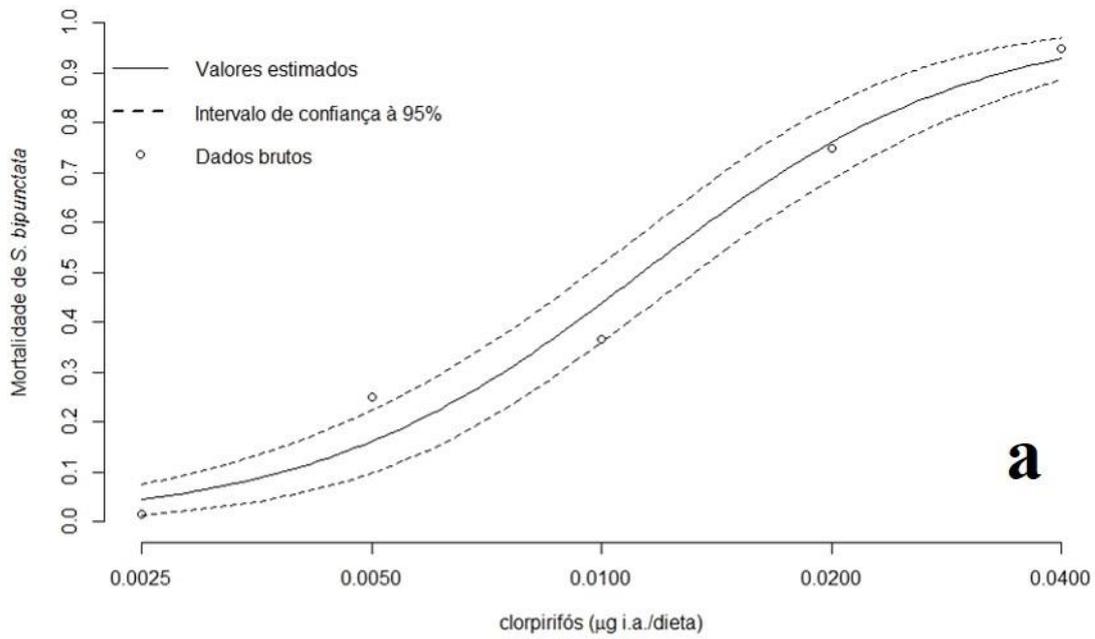
233 **Resultados**

234 Os testes de toxicidade aguda realizados com as formulações comerciais dos
235 inseticidas clorpirifós e fosmete, apresentaram diferentes níveis de toxicidade para *S.*
236 *bipunctata* e *T. fiebrigi*, dependendo do modo de exposição.

237

238 **Teste Oral Agudo**

239 A CL_{50} do inseticida clorpirifós para *S. bipunctata* foi de 0,0112 $\mu\text{g i.a./}\mu\text{L}$ dieta
240 e de 0,0018 $\mu\text{g i.a./}\mu\text{L}$ dieta para *T. fiebrigi* (Fig. 4). A toxicidade desse inseticida diferiu
241 significativamente entre as espécies de abelhas, sendo as forrageiras de *T. fiebrigi* mais
242 suscetíveis à ingestão do inseticida quando comparadas com *S. bipunctata*. As diferenças
243 significativas nos valores da CL_{50} foram evidenciadas pela não sobreposição dos
244 intervalos de confiança (Tabela 1).



245

246 **Figura 4. Toxicidade oral aguda (48 horas) do inseticida clorpirifós para abelhas**

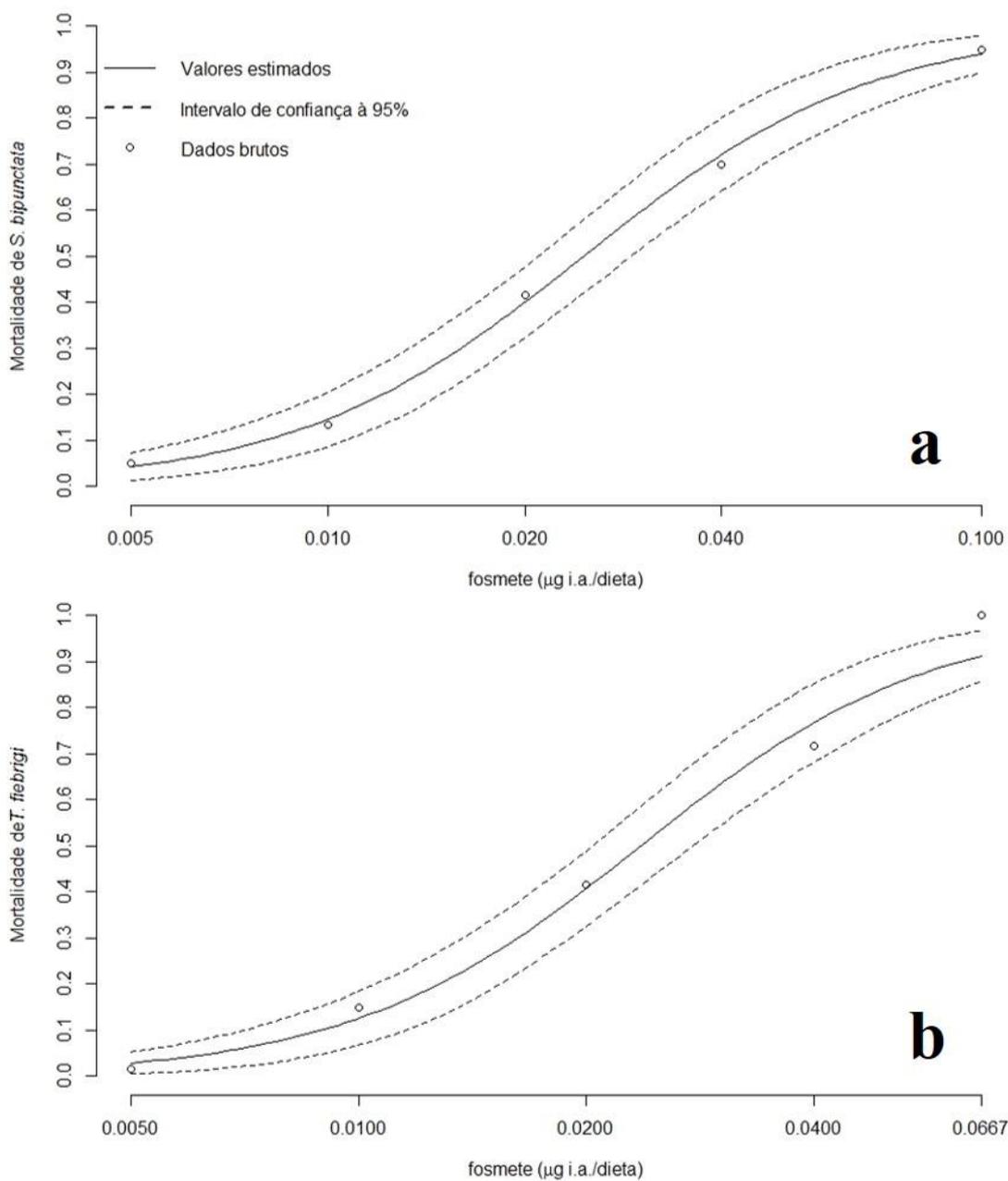
247 **forrageiras de *Scaptotrigona bipunctata* (a) e *Tetragonisca fiebrigi* (b).**

248

249 Nos testes com o inseticida fosmete a CL_{50} para *S. bipunctata* foi de 0,0245 μg

250 i.a./ μL dieta e para *T. fiebrigi* de 0,0236 $\mu\text{g i.a./}\mu\text{L}$ dieta (Fig. 5). A sobreposição dos

251 intervalos de confiança indicou que não houve diferença significativa na suscetibilidade
252 entre *S. bipunctata* e *T. fiebrigi* para esse inseticida (Tabela 1).
253



254
255 **Figura 5. Toxicidade oral aguda (48 horas) do inseticida fosmete para abelhas**
256 **forrageiras de *Scaptotrigona bipunctata* (a) e *Tetragonisca fiebrigi* (b).**

257

258 Entre os inseticidas organofosforados avaliados clorpirifós apresentou maior
 259 toxicidade para as duas espécies de abelhas testadas, indicada pela não sobreposição dos
 260 intervalos de confiança (Tabela 1).

261

262 **Tabela 1. Toxicidade oral aguda de inseticidas para abelhas forrageiras de**
 263 ***Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi*.**

Inseticidas	Espécies	N	CL ₅₀ (I.C. 95%) µg i.a./µL dieta	χ ²	P
Clorpirifós (Lorsban®)	<i>S. bipunctata</i>	360	0,0112 (0,0095 - 0,0130)	6,367	0,095
	<i>T. fiebrigi</i>	360	0,0018 (0,0017 - 0,0020)	-	-
Fosmete (Imidan®)	<i>S. bipunctata</i>	360	0,0245 (0,0206 - 0,0285)	0,490	0,921
	<i>T. fiebrigi</i>	360	0,0236 (0,0201 - 0,0271)	3,446	0,328

264 *O teste Trimmed Spearman Karber não disponibiliza os valores de χ² e P.

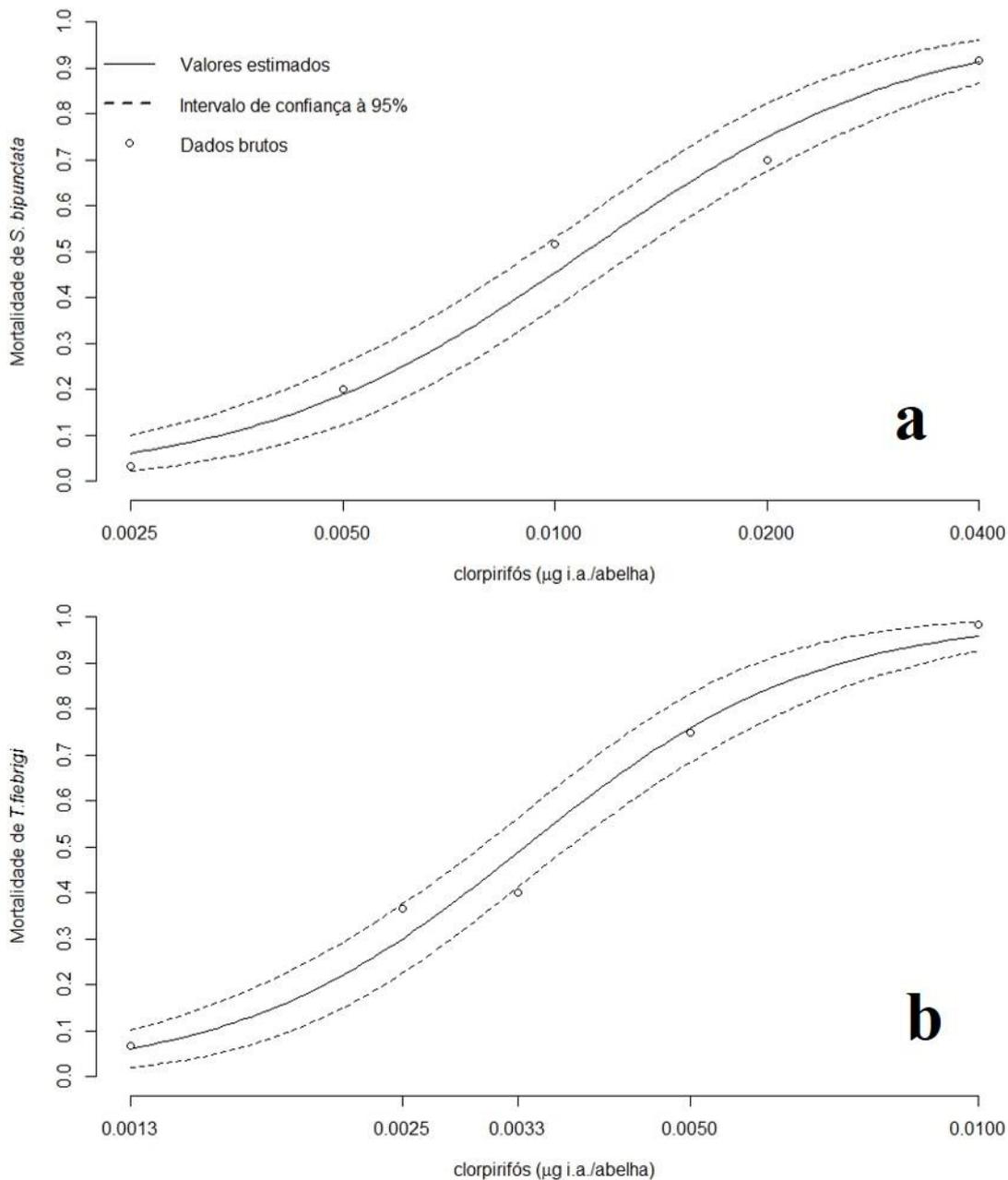
265 As duas espécies de abelhas não apresentaram diferença no consumo do alimento
 266 com adição de inseticida, quando comparado aos seus grupos controles (solução de
 267 sacarose sem inseticida), demonstrado pelo teste ANOVA: *S. bipunctata* (clorpirifós: F=
 268 2,974, p= 0,032, Tukey, p= 0,081; fosmete: F= 0,237, p= 0,942); *T. fiebrigi* (clorpirifós:
 269 F= 0,864, p= 0,533; fosmete: F= 1,990, p= 0,153).

270

271 **Teste Tópico Agudo**

272 Nos testes para avaliação de toxicidade tópica o valor da DL₅₀ de clorpirifós foi
 273 de 0,0110 µg i.a./abelha para *S. bipunctata* e de 0,0033 µg i.a./abelha para *T. fiebrigi* (Fig.
 274 6).

275



276

277 **Figura 6. Toxicidade tóxica aguda (48 horas) do inseticida clorpirifós para abelhas**
 278 **forrageiras de *Scaptotrigona bipunctata* (a) e *Tetragonisca fiebrigi* (b).**

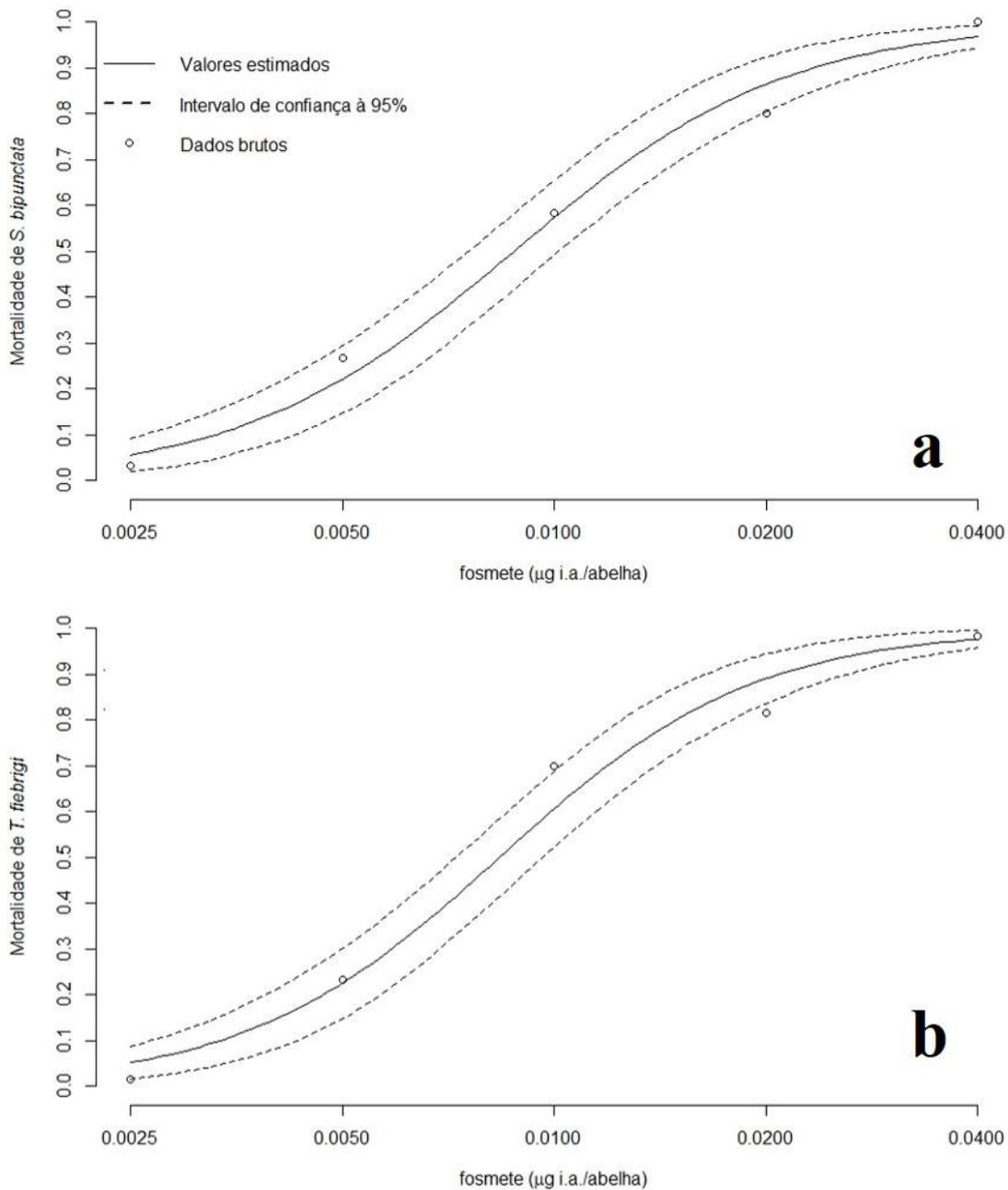
279

A DL_{50} do inseticida fosmete para *S. bipunctata* foi de 0,0087 µg i.a./abelha e para

280

T. fiebrigi foi de 0,0083 µg i.a./abelha (Fig. 7).

281



282

283 **Figura 7. Toxicidade tóxica aguda (48 horas) do inseticida fosmete para abelhas**
 284 **forrageiras de *Scaptotrigona bipunctata* (a) e *Tetragonisca fiebrigi* (b).**

285

286

287

288

De acordo com os resultados dos intervalos de confiança das DL_{50} , houve diferença significativa entre a suscetibilidade das espécies de abelhas avaliadas topicamente para o inseticida clorpirifós, sendo as forrageiras de *S. bipunctata* mais tolerantes quando comparadas com *T. fiebrigi*. Entretanto, devido à sobreposição dos

289 intervalos de confiança não houve diferença significativa na suscetibilidade entre *S.*
290 *bipunctata* e *T. fiebrigi* para o inseticida fosmete (Tabela 2).

291 Clorpirifós e fosmete não apresentaram diferenças de toxicidade para *S.*
292 *bipunctata* devido à sobreposição dos intervalos de confiança. Porém, para *T. fiebrigi*
293 clorpirifós apresentou maior toxicidade tópica quando comparado ao inseticida fosmete
294 (Tabela 2).

295

296 **Tabela 2. Toxicidade tópica aguda de inseticidas para abelhas forrageiras de**
297 ***Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi*.**

298

Inseticidas	Espécies	N	DL ₅₀ (I.C. 95%) µg i.a./abelha	χ ²	P
Clorpirifós (Lorsban®)	<i>S. bipunctata</i>	420	0,0110 (0,0092 - 0,0128)	2,5563	0,4652
	<i>T. fiebrigi</i>	420	0,0033 (0,0030 - 0,0037)	4,1091	0,2499
Fosmete (Imidan®)	<i>S. bipunctata</i>	420	0,0087 (0,0075 - 0,0100)	5,4673	0,1406
	<i>T. fiebrigi</i>	420	0,0083 (0,0072 - 0,0095)	7,2309	0,0649

299

300 Em relação aos testes realizados com acetona (controle do solvente), não foi
301 evidenciada diferença significativa na taxa de mortalidade quando comparados aos
302 grupos controle (nenhuma aplicação), demonstrado pelo teste de qui-quadrado (χ² =
303 1,200, p= 0,273).

304

305 **Discussão**

306 Dentre culturas que ofertam flores atrativas para abelhas, a maçã se destaca pela
307 alta dependência de polinizadores [6]. Dessa forma, consideramos relacionar as
308 concentrações recomendadas para os pomares de maçã com as CL₅₀ obtidas neste estudo.

309 De acordo com os resultados obtidos nos testes de toxicidade oral aguda, foi
310 observado que as concentrações recomendadas dos inseticidas organofosforados
311 clorpirifós e fosmete, para uso em pomares de maçã no Brasil, são consideravelmente
312 mais elevadas do que os valores de CL₅₀ determinados neste estudo. A concentração
313 recomendada do inseticida clorpirifós (Lorsban®) para pomares de maçã varia de 0,48 a
314 0,72 µg i.a./µL de calda que representa 42 a 64 vezes o valor da CL₅₀ para *S. bipunctata*,
315 e 266 a 400 vezes o valor da CL₅₀ para *T. fiebrigi*. A aplicação recomendada do inseticida
316 fosmete (Imidan®) em pomares de maçã varia de 0,75 – 1,00 µg i.a./µL de água que
317 representa 30 a 40 vezes o valor da CL₅₀ para *S. bipunctata*, e 30 a 42 vezes o valor da
318 CL₅₀ para *T. fiebrigi*.

319 Outros estudos também demonstram que os inseticidas clorpirifós (Lorsban®) e
320 fosmete (Imidan®) são altamente tóxicos para as abelhas [59,60]. Segundo Carrasco-
321 Letelier et al. [61], a dose recomendada de clorpirifós em lavouras de soja é 23 vezes
322 maior que o valor da DL₅₀ para *A. mellifera*, indicando que o uso desse inseticida pode
323 colocar em risco a atividade apícola em áreas próximas a cultura.

324 De acordo com os valores da DL₅₀ obtidos através dos testes de exposição tópica
325 os inseticidas clorpirifós e fosmete foram classificados como altamente tóxicos para as
326 abelhas (DL₅₀ < 2,0 µg i.a./abelha) [62].

327 As forrageiras de *S. bipunctata* foram mais tolerantes por via tópica ao inseticida
328 clorpirifós que *T. fiebrigi*. Essa diferença de suscetibilidade pode estar relacionada a
329 diferenças na espessura e composição química da cutícula [63]. Nas abelhas sem ferrão a
330 cutícula consiste de uma camada externa lipídica formada por várias classes de compostos
331 químicos que são determinados geneticamente e variam entre as espécies [64-66]. Essas

332 diferenças nos compostos cuticulares podem facilitar a penetração do inseticida na
333 cutícula, causando maior toxicidade de acordo com a espécie de abelha.

334 No teste de exposição tópica para *S. bipunctata*, não houve diferenças
335 significativas na toxicidade dos inseticidas clorpirifós e fosmete, semelhantes ao
336 encontrado por Kanga e Somorin [67] ao comparar estes dois inseticidas em adultos de
337 *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae).

338 Em *T. fiebrigi* o inseticida clorpirifós se mostrou mais tóxico que fosmete. Esse
339 fato possivelmente está relacionado ao caráter lipofílico desse inseticida associado a
340 composição lipídica da cutícula da abelha [63]. Compostos lipofílicos apresentam maior
341 afinidade com a cutícula, dessa forma são facilmente absorvidos alcançando seu alvo de
342 ação rapidamente [68]. Essa hipótese se baseia na baixa solubilidade em água do
343 inseticida clorpirifós (1,05 mg/L a 20°C) comparada a de fosmete (24,4 mg/L a 20°C), os
344 compostos mais lipofílicos (baixa solubilidade em água) podem penetrar mais rápido
345 através da cutícula [68-70].

346 Comparando os resultados com a DL₅₀ estabelecida para *A. mellifera* percebe-se
347 que esses valores são significativamente superiores às doses letais encontradas para as
348 forrageiras de *S. bipunctata* e *T. fiebrigi*. A DL₅₀ tópica calculada para *A. mellifera* para
349 clorpirifós (Lorsban®) é 0,11 µg/abelha e para fosmete (Imidan®) é de 1,13 µg/abelha
350 [71]. Ou seja, *A. mellifera* é cerca de 33 vezes mais tolerante ao inseticida clorpirifós e
351 até 136 vezes mais tolerante ao inseticida fosmete que *T. fiebrigi*, mostrando que os
352 agrotóxicos avaliados foram altamente tóxicos para as abelhas nativas.

353 Para avaliar a resposta de toxicidade aguda dos inseticidas clorpirifós e fosmete,
354 foram utilizadas duas vias de exposição: oral e tópica, pois quando as abelhas estão
355 forrageando em áreas tratadas com agrotóxicos [72] a absorção desses produtos pode

356 ocorrer através da ingestão de pólen e néctar com resíduos de inseticidas [10,73,74] ou
357 por via tópica, quando produtos químicos suspensos no ar entram em contato com o corpo
358 da abelha [75].

359 A utilização de distintos meios de avaliação de toxicidade contribui para o
360 entendimento da ação dos agrotóxicos sobre os polinizadores, fornecendo assim
361 informações importantes a respeito da resposta desses organismos a substâncias tóxicas
362 liberadas no meio ambiente [76].

363 A intoxicação das abelhas através da alimentação é uma possibilidade, pois muitos
364 estudos relatam a presença de resíduos de clorpirifós e fosmete no pólen e néctar das
365 plantas tratadas [73,74], bem como no mel e pólen armazenados [38,77,78].

366 Nesse estudo constatamos que as forrageiras *S. bipunctata* foram mais tolerantes
367 ao inseticida clorpirifós que *T. fiebrigi* via exposição oral. Entretanto, a suscetibilidade
368 entre as duas espécies de abelhas não apresentou diferenças significativas em relação ao
369 inseticida fosmete.

370 A diferença de suscetibilidade entre as espécies avaliadas pode estar relacionada
371 à sua capacidade de detoxicação. Quando a via de entrada se dá pela ingestão de pólen e
372 néctar contaminados, a toxicidade dos produtos pode ser reduzida, devido à ação de várias
373 enzimas destoxicadoras presentes no sistema digestório das abelhas [79].

374 Embora não existam outros estudos que avaliem a toxicidade oral de clorpirifós e
375 fosmete para outras espécies de abelha através da CL_{50} , pesquisas com outros agrotóxicos,
376 utilizando metodologia semelhante, vêm demonstrando que as abelhas sem ferrão são
377 mais sensíveis por exposição oral quando comparadas à *A. mellifera*. Por exemplo, *S.*
378 *postica* (Latreille) é mais suscetível aos inseticidas imidacloprido (CL_{50} 14,28 ng i.a./ μ L
379 dieta) e fipronil (CL_{50} 0,24 ng i.a./ μ L dieta) do que *A. mellifera* (CL_{50} 41,0 ng i.a./ μ L

380 dieta / CL₅₀ 1,27 ng i.a./ μL dieta), assim como *Melipona scutellaris* Latreille (CL₅₀ 0,011
381 ng i.a./μL dieta) é mais sensível ao inseticida fipronil quando comparada a *A. mellifera*
382 (CL₅₀ 1,27 ng i.a./ μL dieta) [40,48,80].

383 Dentre os organofosforados avaliados, clorpirifós apresentou os menores valores
384 de CL₅₀, sendo considerado o inseticida com maior toxicidade para as duas espécies de
385 abelhas. De um modo geral, os inseticidas organofosforados apresentam baixa toxicidade
386 quando ingeridos, sendo rapidamente metabolizados ou eliminados, exceto por alguns
387 compostos persistentes como o inseticida clorpirifós, que pode durar tempo suficiente
388 para causar toxicidade durante a ingestão [18]. Nesse sentido, Sanchez-Bayo e Goka [18]
389 relatam que a ingestão de clorpirifós pode representar um risco para *A. mellifera*, por
390 conta de sua alta toxicidade e grande quantidade de resíduos encontrados no pólen e no
391 mel. Em acréscimo, experimentos em laboratório indicam que até três dias após a
392 aplicação desse inseticida no campo o pólen e o néctar são potencialmente perigosos para
393 as abelhas [35].

394 Em relação à alimentação, não foram evidenciadas diferenças significativas no
395 consumo de alimento com adição de clorpirifós e fosmete para as duas espécies de abelhas
396 e mesmo as concentrações mais elevadas não apresentaram nenhum efeito de repelência
397 durante o teste oral. Kessler et al. [81] utilizando experimentos de preferência alimentar,
398 mostraram que *A. mellifera* e *Bombus terrestris* L. não evitam o alimento com adição de
399 inseticidas neonicotinóides (imidacloprido, tiametoxam e clotianidina), e que as abelhas
400 preferem consumir as soluções de sacarose com adição de imidacloprido ou tiametoxam
401 do que a solução de sacarose sem inseticida.

402 Ao comparar a toxicidade de cada inseticida em relação às vias de aplicação
403 utilizadas neste estudo (oral e tópica), nota-se que a suscetibilidade de cada espécie de

404 abelha diferiu. Para as forrageiras de *S. bipunctata* não houve diferença significativa entre
405 a ingestão e a exposição tópica para o inseticida clorpirifós. No entanto, para *T. fiebrigi*
406 esse inseticida se mostrou mais tóxico quando administrado oralmente. Estes dados
407 diferem dos resultados encontrados por Suchail et al. [82], em que o inseticida clorpirifós
408 é considerado 4 vezes mais tóxico em aplicação por contato do que por ingestão para *A.*
409 *mellifera* (DL₅₀ por contato = 59ng/abelha; DL₅₀ por ingestão = 250 ng/abelha). Estas
410 diferenças podem ser resultado das distinções morfológicas e fisiológicas de cada abelha,
411 ou devido à utilização de metodologias diferentes entre os estudos. Em nosso trabalho os
412 dados de toxicidade oral foram determinados através da CL₅₀, que consiste em uma
413 concentração (µg i.a./µL dieta), que mata 50% dos indivíduos. A análise dos resultados
414 pela CL₅₀ é feita independentemente da quantidade de alimento ingerida por cada abelha,
415 diferentemente da DL₅₀ utilizada em muitos estudos de toxicidade oral. A DL₅₀ se baseia
416 em estimativas do consumo de alimento com o ingrediente ativo para cada indivíduo,
417 considerando que todas as abelhas se alimentam de quantidades iguais em um
418 determinado período de tempo. Segundo Stevenson [83] são esperados erros nos valores
419 de DL₅₀ dos testes via exposição oral, pois as doses são oferecidas a um grupo de abelhas
420 simultaneamente e não individualmente.

421 Diferentemente do inseticida clorpirifós, fosmete apresentou maior toxicidade por
422 via tópica do que por exposição oral para ambas as espécies de abelhas. Essa diferença
423 de toxicidade entre os inseticidas está relacionada ao seu modo de ação [83,84]. Enquanto
424 clorpirifós pode agir nos insetos por contato, ingestão ou fumigação [72], fosmete
425 demonstra maior efeito tóxico por contato [32]. Pesquisando o efeito de fosmete para a
426 abelha solitária *Megachile rotundata* (Fabricius), Gradish et al. [85] verificaram que esse
427 inseticida foi altamente tóxico por via tópica. Além disso, Alston et al. [37] estudando a

428 mesma espécie de abelha, observaram que após a pulverização desse produto em pomares
429 de maçã, houve aumento da mortalidade de adultos e redução significativa na atividade
430 de nidificação nos pomares onde foi aplicado o inseticida comparado aos pomares sem
431 aplicação. Em outro trabalho, Gradish et al. [86] constataram que devido a elevada taxa
432 de aplicação de fosmete nos pomares de mirtilo no Canadá, esse inseticida representa um
433 perigo para *Bombus impatiens* Cresson, através da exposição por contato direto.

434 Em relação à suscetibilidade das espécies de abelhas avaliadas, os resultados
435 mostraram diferença significativa, indicando que as forrageiras *T. fiebrigi* foram mais
436 suscetíveis ao inseticida clorpirifós quando comparadas a *S. bipunctata*. Essas diferenças
437 de susceptibilidade aos agrotóxicos, observadas entre as abelhas, têm sido associadas às
438 diferentes características específicas [39,76], tais como o peso corporal da abelha, a
439 capacidade para detoxicação e a taxa de penetração do inseticida pela cutícula [87-89]. O
440 peso corporal poderia influenciar na suscetibilidade das abelhas, ou seja, espécies com
441 maior peso seriam mais tolerantes que as espécies com menor peso. Assim, uma operária
442 de *S. bipunctata* que pesa em média 18,28 mg (n=60, EP= 0,002) é mais tolerante a ação
443 de determinado inseticida que uma operária de *T. fiebrigi* que pesa em média 4,36 mg
444 (n=60, = EP= 0,002). Resultados semelhantes foram observados em *S. tubiba* (Smith)
445 (12,3 mg) que se mostrou mais suscetível ao inseticida malatim quando comparada com
446 abelhas de maior peso, *Trigona spinipes* (Fabricius) (14 mg) e *A. mellifera* (128 mg) [90],
447 e em *Melipona beecheii* Bennet que foi menos suscetível aos inseticidas permetrina e
448 metomil em comparação com *Trigona nigra* Cresson, espécie de menor peso [44]. Estes
449 dados corroboram a proposta de Johansen [91] de que a suscetibilidade está diretamente
450 relacionada com as relações de superfície e volume das espécies de abelhas.

451 Os resultados obtidos neste estudo indicam que os inseticidas organofosforados
452 clorpirifós (Lorsban[®]) e fosmete (Imidan[®]) são potencialmente perigosos para *S.*
453 *bipunctata* e *T. fiebrigi*, tanto por via tópica como pela ingestão, considerando às doses
454 recomendadas para aplicação agrícola. Dessa forma, uma vez que o uso de agrotóxicos é
455 uma das principais causas do declínio mundial das populações de abelhas [7,12,92,93],
456 se faz necessário estabelecer limites no uso destes produtos.

457 É importante considerar que a toxicidade dos agrotóxicos pode variar entre testes
458 de laboratório e a realidade observada nos campos [84]. Ou seja, muitas vezes os testes
459 realizados em condições de laboratório, superestimam os efeitos letais dos inseticidas
460 quando em condições naturais [40,84]. Além disso, a susceptibilidade em áreas agrícolas
461 depende de outras circunstâncias, como fatores abióticos, prazo de degradação dos
462 agrotóxicos e comportamento das abelhas [84,85]. Entretanto, Stevenson [83] indicou que
463 há uma correlação entre a toxicidade relativa determinada nos testes de laboratório e o
464 efeito do agrotóxico em abelhas no campo.

465 É notório que a ação dos agrotóxicos não está restrita às culturas-alvo, podendo
466 alcançar habitats próximos pela ação das correntes de ar, atingindo outras fontes de
467 forrageamento e locais de nidificação [7,15]. Dentre as formas de aplicação de inseticidas,
468 a pulverização foliar é considerada como aquela que oferece maiores riscos de exposição,
469 tanto para inimigos naturais que controlam pragas [94] quanto para abelhas [10]. A
470 aplicação dos organofosforados avaliados neste estudo é especialmente foliar, no entanto
471 os períodos de aplicações e intervalos de segurança encontrados nos rótulos e bulas dos
472 produtos se referem à saúde humana. Entretanto, os resultados evidenciados neste estudo
473 apontam os riscos às abelhas em decorrência do uso de clorpirifós e fosmete, e indicam a

474 necessidade de uma revisão dos limites de aplicação e das concentrações recomendadas
475 para utilização em campo.

476 Roubos et al. [94] acrescentam que os impactos negativos de inseticidas a
477 populações de inimigos naturais que são utilizados para o controle de pragas podem ser
478 reduzidos se forem aplicados de maneira que minimizem a exposição. Nesse caso, os
479 mesmos autores referem às aplicações diretamente no solo como menos prejudiciais do
480 que as outras formas de aplicações. Além disso, Morales-Rodriguez e Peck [95]
481 demonstram que combinações sinérgicas de inseticidas biológicos e químicos podem ser
482 alternativas promissoras para o controle de pragas. Em acréscimo, Xavier et al. [96]
483 apresentam como alternativa a aplicação de inseticidas botânicos, os quais não
484 ocasionaram efeitos adversos em seus testes com abelhas sem ferrão.

485 Dessa maneira, é fundamental a proposição de medidas para minimizar o impacto
486 sobre os polinizadores. A manutenção de remanescentes seminaturais ou faixas de
487 vegetação silvestre próximos aos cultivos, a identificação e uso de inseticidas de menor
488 toxicidade, a utilização de manejo integrado de pragas, evitar a aplicação dos produtos
489 durante a floração da cultura e proteger as colônias sempre que possível [15,31,85,86] são
490 alternativas relevantes para mitigar os impactos sobre as abelhas, ocasionados pela
491 aplicação dos inseticidas organofosforados em questão. Através das boas práticas
492 agrícolas o meio ambiente, a rentabilidade da agricultura [93] e a segurança alimentar
493 [81,97] serão beneficiados.

494 As diferenças entre a suscetibilidade das abelhas nativas em relação a *A. mellifera*
495 ressaltam a importância de incluir outras espécies de abelhas nos testes de toxicidade
496 exigidos para a autorização de uso de agrotóxicos, a fim de garantir a proteção das abelhas
497 nativas [39,98,99]. Assim, sugere-se que novas análises dos efeitos letais e subletais

498 sejam realizadas em espécies nativas, através de testes de campo e semi-campo para
499 agrotóxicos indicados a culturas que ofertam flores atrativas às abelhas, a fim de garantir
500 a preservação da biodiversidade, a segurança das abelhas nativas, bem como o serviço de
501 polinização prestado pelas abelhas.

502

503 **Agradecimentos**

504 Agradecemos à Dra. Guendalina Turcato Oliveira do Laboratório de Fisiologia da
505 Conservação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pela auxílio no
506 preparo das soluções utilizadas nos experimentos, e ao Dr. Alexandre Arenzon do
507 Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio
508 nas análises estatísticas.

509

510 **Referências**

- 511 1. Costanza R, D'Arge R, Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, et al. The value of
512 the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*. 1997; 387: 253-260.
- 513 2. Ricketts TH, Regetz J, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen, C, Bogdanski
514 A, et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns?
515 *Ecology Lett*. 2008; 11: 499-515. doi: 10.1111/j.1461-0248.2008.01157.x
- 516 3. Kearns CA, Inouye DW, Waser NM. Endangered Mutualisms: The conservation of
517 plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1998; 29: 83-112.
- 518 4. Ollerton J, Winfree R, Tarrant S. How many flowering plants are pollinated by
519 animals? *Oikos*. 2011; 120: 321-326. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x

- 520 5. Jay SC. Spatial management of honey bees on crops. *Ann. Rev. Entomol.* 1986; 31:
521 49-65. doi:10.1080/0005772X.1986.11098882
- 522 6. Klein A-M, Vaissière BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham, SA, Kremen C,
523 et al. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc. R. Soc.*
524 *B.* 2007; 274: 303-313. doi:10.1098/rspb.2006.3721
- 525 7. Potts SG, Biesmeijer JC, Kremen C, Neumann P, Schweiger O, Kunin WE. Global
526 pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.* 2010; 25(6): 345-
527 353. doi:10.1016/j.tree.2010.01.007
- 528 8. Delaplane KS, Mayer DF. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000
529 - crop pollination by bees. Nova Iorque: CABI Publishing; 2000.
- 530 9. Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF, et al. Patterns of
531 widespread decline in North American bumble bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
532 2011; 108(2): 662-667. doi:10.1073/pnas.1014743108
- 533 10. Dively GP, Kamel A. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and
534 their potential exposure to pollinators. *J. Agric. Food Chem.* 2012; 60: 4449-4456.
535 doi:10.1021/jf205393x
- 536 11. Kevan PG. Pollinators as bioindicators of the state of environment: species, activity
537 and biodiversity. *Agr. Ecosyst. Environ.* 1999; 74: 373-393. doi:10.1016/S0167-
538 8809(99)00044-4
- 539 12. Kremen C, Williamson NM, Thorp RW. Crop pollination from native bees at risk from
540 agricultural intensification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99(26): 16812-16816.
541 doi: 10.1073/pnas.262413599

- 542 13. Aizen MA, Garibaldi LA, Cunningham SA, Klein AM. How much does agriculture
543 depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. *Ann. Bot.*
544 2009; 103: 1579-1588. doi:10.1093/aob/mcp076
- 545 14. Kremen C. Pollination services and community composition: does it depend on
546 diversity, abundance, biomass or species traits?, In: Freitas BM, Portela JOB. Solitary
547 bees: conservation, rearing and management for pollination. Fortaleza: Universidade
548 Federal do Ceará; 2004. pp. 115-124.
- 549 15. Pinheiro JN, Freitas BM. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e
550 perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. *Oecologia Australis.*
551 2010; 14(1): 266-281. doi:10.4257/oeco.2010.1401.16
- 552 16. Freitas BM, Imperatriz-Fonseca VL, Medina LM, Kleinert ADMP, Galetto L, Nates-
553 Parra G, et al. Diversity, threats and conservation of native bees in the
554 Neotropics. *Apidologie.* 2009; 40: 332-346. doi: 10.1051/apido/2009012
- 555 17. Nicholls CI, Altieri MA. Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators
556 in agroecosystems. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2013; 33: 257-274. doi:
557 10.1007/s13593-012-0092-y
- 558 18. Sanchez-Bayo F, Goka K. Pesticide residues and bees – A risk assessment. *PLoS ONE.*
559 2014; 9(4): e94482. doi:10.1371/journal.pone.0094482
- 560 19. Imperatriz-Fonseca VL. Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e
561 polinização. 2004; Available:
562 http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicosaosocossistemas_polinizadores_vera.pdf
- 563 20. Roubik DW. Tropical agriculture: the value of bees to the coffee harvest. *Nature.* 2002;
564 417(6890): 708-708. doi:10.1038/417708a

- 565 21. Freitas BM, Imperatriz-Fonseca VL. Economic value of Brazilian cash crops and
566 estimates of their pollination constrains. In: FAO report 02, Agreement FAO-FUSP.
567 Economic value of pollination and pollinators. São Paulo; 2004.
- 568 22. Gamito LM, Malerbo-Souza DT. Visitantes florais e produção de frutos em cultura de
569 laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). Acta Sci. Anim. Sci. 2006; 28(4): 483-488. doi:
570 10.4025/actascianimsci.v28i4.612
- 571 23. Chiari WC, Toledo VAA, Hoffmann-Campo CB, Rúvolo-Takasusuki MCC, Oliveira
572 TCS, Toledo A, et al. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica [*Glycine max*
573 (L.) Merrill] Roundup Ready™ cv BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. Acta
574 Sci. Agron. 2008; 30(2): 267-271. doi:10.4025/actasciagron.v30i2.1787
- 575 24. McGregor SE. Insect pollination of cultivated crop-plants. U.S.D.A. Agriculture
576 Handbook. 1976; 496: 93–98. Available: <http://gears.tucson.ars.ag.gov/book/>
- 577 25. Gardner KE, Ascher JS. Notes on the native bee pollinators in New York apple
578 orchards. J. New York Entomol. Soc. 2006; 114(1-2): 86-91. doi:10.1664/0028-
579 7199(2006)114[86:NOTNBP]2.0.CO;2
- 580 26. Morse RA, Calderone NW. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in
581 2000. New York: Cornell University; 2000.
- 582 27. Garófalo CA, Martins CF, De Aguiar CML, Del Lama MA, Santos IA-D. As abelhas
583 solitárias e perspectivas para seu uso na polinização no Brasil, In: Imperatriz-Fonseca
584 VL, Canhos DAL, Saraiva AM. Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas
585 para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo:
586 EDUSP; 2011. pp. 191-212.
- 587 28. Vicens N, Bosch J. Pollinating efficacy of *Osmia cornuta* and *Apis mellifera*
588 (Hymenoptera: Megachilidae, Apidae) on ‘Red Delicious’ apple environmental.

589 Entomology. 2000; 29(2): 235-240. doi:10.1603/0046-
590 225X(2000)029[0235:PEOOCA]2.0.CO;2

591 29. Thomson JD, Goodell K. Pollen removal and deposition by honeybee and bumblebee
592 visitors to apple and almond flowers. J. Appl. Ecol. 2001; 38: 1032–1044.

593 30. Adamson NL, Roulston TH, Fell RD, Mullins DE. From April to August - Wild bees
594 pollinating crops through the growing season in Virginia, USA. Environ. Entomol.
595 2012; 41(4): 813-821. doi:10.1603/EN12073

596 31. Rocha MCLSA. Efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas silvestres no Brasil: proposta
597 metodológica de acompanhamento. Brasília: Ibama; 2012.

598 32. Kovaleski A, Ribeiro LG. Manejo de Pragas na Produção Integrada de Maçã, In:
599 Protas, JFDS, Sanhueza RMV. Produção integrada de frutas: o caso da maçã no Brasil.
600 Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho; 2003. pp. 61-68.

601 33. Stanley J, Sah K, Jain SK, Bhatt JC, Sushil SN. Evaluation of pesticide toxicity at their
602 field recommended doses to honeybees, *Apis cerana* and *A. mellifera* through
603 laboratory, semi-field and field studies. Chemosphere. 2015; 119: 668-674.
604 doi:10.1016/j.chemosphere.2014.07.039

605 34. Rehman S, Rehman S, Waliullah MIS. Chlorpyrifos-induced neuro-oxidative damage
606 in bee. Toxicol. Environ. Health. Sci. 2012; 4(1): 30-36. doi: 10.1007/s13530-012-
607 0114-9

608 35. Cutler GC, Purdy J, Giesy JP, Solomon KR. Risk to pollinators from the use of
609 chlorpyrifos in the United States, In: Giesy JP, Solomon KR, editors. Ecological risk
610 assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in the United States, Rev.
611 Environ. Contam. Toxicol. 2014. pp.219-265. doi:10.1007/978-3-319-03865-0_7

- 612 36. Pena MF, Amaral EH, Sperling EV, Cruz I. Método para determinação de resíduos de
613 clorpirifós em alface por cromatografia a líquido de alta eficiência. *Pesticidas*. 2003;
614 13(1): 37-44
- 615 37. Alston DG, Tepedino VJ, Bradley BA, Toler TR, Griswold TL, Susanna M, et al.
616 Effects of the insecticide phosmet on solitary bee foraging and nesting in orchards of
617 Capitol Reef National Park, Utah. *Environ. Entomol.* 2007; 36(4): 811-816.
618 doi:10.1603/0046-225X(2007)36[811:EOTIPO]2.0.CO;2
- 619 38. Silva IP, Oliveira FAS, Pedroza HP, Gadelha ICN, Melo MM, Soto-Blanco B.
620 Pesticide exposure of honeybees (*Apis mellifera*) pollinating melon crops. *Apidologie*.
621 2015; 1-13. doi:10.1007/s13592-015-0360-3.
- 622 39. Brittain C, Potts SG. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of
623 bees and the consequences for pollination. *Basic Appl. Ecol.* 2011; 12: 321-331.
624 doi:10.1016/j.baae.2010.12.004
- 625 40. Lourenço CT, Carvalho SM, Malaspina O, Nocelli RCF. Oral toxicity of fipronil
626 insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). *Bull.*
627 *Environ. Contam. Toxicol.* 2012; 89: 921-924. doi:10.1007/s00128-012-0773-x
- 628 41. Heard TA. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu. Rev. Entomol.* 1999;
629 44: 183-206. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.183
- 630 42. Venturieri GC, Alves DA, Villas-Bôas JK, Carvalho CA, Menezes C, Neto AV, et al.
631 Meliponicultura no Brasil: Situação atual e perspectivas futuras para o uso na
632 polinização, In: Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL, Saraiva AM, Polinizadores no
633 Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação
634 e serviços ambientais. São Paulo: EDUSP; 2011. pp. 227-255.

- 635 43. Slaa EJ, Chaves LAS, Malagodi-Braga KS, Hofstede FE. Stingless bees in applied
636 pollination: practice and perspectives. *Apidologie*. 2006; 37: 293-315.
637 doi:10.1051/apido:2006022
- 638 44. Valdovinos-Núñez GR, Quezada-Euán JG, Ancona-Xiu P, Moo-Valle H, Carmona
639 A. Sánchez ER. Comparative toxicity of pesticides to stingless bees (Hymenoptera:
640 Apidae: Meliponini). *J. Econ. Entomol.* 2009; 102(5): 1737-1742.
641 doi:10.1603/029.102.0502
- 642 45. Sánchez D, Solórzano EDJ, Liedo P, Vandame R. Effect of the natural pesticide
643 spinosad (GF-120 formulation) on the foraging behavior of *Plebeia moureana*
644 (Hymenoptera: Apidae). *J. Econ. Entomol.* 2012; 105 (4): 1243-1237.
645 doi:10.1603/EC12047
- 646 46. Tomé HVV, Martins GF, Lima MAP, Campos LAO, Guedes RNC. Imidacloprid-
647 induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee
648 *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *PLoS ONE*. 2012; 7(6): e38406.
649 doi:10.1371/journal.pone.0038406
- 650 47. Ferreira RAC, Zacarin ECMS, Malaspina O, Bueno OC, Tomotake MEM, Pereira
651 AM. Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille,
652 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. *Micron*. 2013; 46: 57-65.
653 doi:10.1016/j.micron.2012.12.008
- 654 48. Jacob CRO, Soares HM, Carvalho SM, Nocelli RCF, Malaspina O. Acute toxicity of
655 fipronil to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille. *Bull Environ. Contam.*
656 *Toxicol.* 2013; 90: 69-72. doi:10.1007/s00128-012-0892-4

- 657 49. Camargo JMF, Pedro SRM. Meliponini Lepeletier, 1836, In: Moure JS, Urban D, Melo
658 GAR. (Orgs.), Catalogue of bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region.
659 2013; Available: <http://www.moure.cria.org.br/catalogue>
- 660 50. Nogueira-Neto P. A criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Tecapis;
661 1997.
- 662 51. Kleinert AMP, Ramalho M, Cortopassi-Laurino M, Ribeiro MF, Imperatriz-Fonseca
663 VL. Abelhas sociais (Bombini, Apini, Meliponini), In: Panizzi AR, Parra JRP, editors.
664 Bioecologia e nutrição de insetos – Base para o manejo integrado de pragas. Brasil:
665 Embrapa; 2009. pp. 373-426.
- 666 52. MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT: Sistemas
667 de Agrotóxicos Fitossanitários. 2015. Available:
668 http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- 669 53. Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, Belzunces LP, Chauzat M-P, Claben C, et al.
670 Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. J. Apicult. Res. 2013;
671 52(4): 1-60. doi:10.3896/IBRA.1.52.4.14
- 672 54. Laurino D, Porporato M, Patetta A, Manino A. Toxicity of neonicotinoid insecticides
673 to honey bees: laboratory tests. Bull. Insectology. 2011; 64(1): 107-113.
- 674 55. OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for
675 the testing of chemicals: Honeybees, acute oral toxicity test. Environmental health
676 safety division, organisation for economic co-operation and development - Number
677 213. Paris: France; 1998.
- 678 56. OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development. Guidelines for
679 the testing of chemicals: Honeybees, acute contact toxicity test. Environmental health

680 safety division, organisation for economic co-operation and development - Number
681 214. Paris: France; 1998.

682 57. Ritz C, Streibig JC. Bioassay Analysis using R. J. Statist. Software. 2005; 12(5): 1-22.

683 58. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for
684 estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol.
685 1977; 11(7): 714-719. doi:10.1021/es60130a004

686 59. McBride DK. Protecting honeybees from pesticides. 2011; Available:
687 <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/pests/e494w.htm>.

688 60. Robinson JV, Philley G. Insect and disease control on peaches, apricots, nectarines,
689 and plums. Texas: Texas A & M University System; 1996.

690 61. Carrasco-Letelier L, Mendoza-Spina Y, Branchiccela MB. Acute contact toxicity test
691 of insecticides (Cipermetrina 25, Lorsban 48E, Thionex 35) on honeybees in the
692 southwestern zone of Uruguay. Chemosphere. 2012; 88: 439-444.
693 doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.062

694 62. Atkins EL, Kellum D, Atkins KW. Reducing pesticide hazards to honey bees:
695 mortality prediction techniques and integrated management strategies. USA: Leaflet-
696 University of California, Cooperative Extension Service; 1981.

697 63. Bacci L, Pereira EJ, Fernandes FL, Picanço MC, Crespo ALB, Campos MR.
698 Seletividade fisiológica de inseticidas a vespas predadoras (Hymenoptera: Vespidae)
699 de *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). BioAssay. 2006; 1(10): 1-7.
700 doi:10.14295/BA.v1.0.38

701 64. Abdalla FC, Jones GR, Morgan, ED, Cruz-Landim CD. Comparative study of the
702 cuticular hydrocarbon composition of *Melipona bicolor* Lepeletier, 1836
703 (Hymenoptera, Meliponini) workers and queens. Genet. Mol. Res. 2003; 2: 191-199.

- 704 65. Blomquist GJ, Bagnères AG. Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and
705 chemical ecology. New York: Cambridge University Press; 2010.
- 706 66. Leonhardt SD, Wallace HM, Blüthgen N, Wenzel F. Potential role of environmentally
707 derived cuticular compounds in stingless bees. *Chemoecology*. 2015; 25: 159-167.
708 doi:10.1007/s00049-015-0185-6
- 709 67. Kanga LH, Somorin AB. Susceptibility of the small hive beetle, *Aethina tumida*
710 (Coleoptera: Nitidulidae), to insecticides and insect growth regulators. *Apidologie*.
711 2012; 43: 95-102. doi:10.1007/s13592-011-0101-1
- 712 68. Leite GLD, Picanco M, Guedes RNC, Gusmão MR. Selectivity of insecticides with
713 and without mineral oil to *Brachygastra lecheguana* (Hymenoptera: Vespidae), a
714 predator of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ceiba*. 2012; 39(2): 191-194.
- 715 69. Milhome MAL, Sousa DOB, Lima FDA, Nascimento RD. Avaliação do potencial de
716 contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na
717 agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. *Eng. Sanit. Ambient*. 2009; 14(3): 363-372.
718 doi:10.1590/S1413-41522009000300010
- 719 70. INNEC - Instituto Nacional De Ecología Y Cambio Climático. Fosmet – datos de
720 identificación. 2012; Available:
721 <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/fosmet.pdf>
- 722 71. Sylvia M. Pesticide Safety 2010 - Insecticides update, bee toxicity and management
723 decisions. In: Cranberry Station Extension meetings; 2010. p. 104.
- 724 72. Fletcher M, Barnett L. Bee pesticide poisoning incidents in the United Kingdom. *Bull.*
725 *Insectology*. 2003; 56(1): 141-145.
- 726 73. Johnson RM, Ellis MD, Mullin CA, Frazier M. Pesticides and honey bee toxicity –
727 USA. *Apidologie*. 2010; 41: 312-331. doi:10.1051/apido/2010018

- 728 74. Mullin CA, Frazier M, Frazier JL, Ashcraft S, Simonds R, VanEngelsdorp D, et al.
729 High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: Implications
730 for honey bee health. PLoS ONE. 2010; 5(3): e9754.
731 doi:10.1371/journal.pone.0009754
- 732 75. Wolff LF, Dos Reis VDA, Santos RSS. Abelhas melíferas: bioindicadores e qualidade
733 ambiental e de sustentabilidade da agricultura familiar de base ecológica -
734 Documentos, 244. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2008.
- 735 76. Del Sarto MCL, Oliveira EE, Guedes RNC, Campos LAO. Differential insecticide
736 susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey
737 bee *Apis mellifera*. Apidologie. 2014; 45: 626-636. doi:10.1007/s13592-014-0281-6
- 738 77. Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada A, Niell S, Carrasco-Letelier L, Besil N, et al.
739 Detection of pesticides in active and depopulated beehives in Uruguay. Int. J. Environ.
740 Res. Public Health. 2011; 8: 3844-3858. doi:10.3390/ijerph8103844
- 741 78. Stoner KA, Eitzer BD. Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected
742 in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. PLoS ONE. 2013;
743 8(10): e77550. doi:10.1371/journal.pone.0077550
- 744 79. Yu SJ, Robinson FA, Nation JL. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera*
745 L. Pestic. Biochem. Physiol. 1984; 22: 360-368. doi:10.1016/0048-3575(84)90029-4
- 746 80. Soares HM, Jacob CRO, Carvalho SM, Nocelli RCF, Malaspina O. Toxicity of
747 imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera:
748 Apidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2015; 94(6): 675-680. doi:10.1007/s00128-
749 015-1488-6

- 750 81. Kessler SC, Tiedeken EJ, Simcock KL, Derveau S, Mitchell J, Softley S, et al. Bees
751 prefer foods containing neonicotinoid pesticides. *Nature*. 2015; 521: 74-76.
752 doi:10.1038/nature14414
- 753 82. Suchail S, Guez D, Belzunces LP. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis*
754 *mellifera* subspecies. *Environ. Toxicol. Chem.* 2000; 19(7): 1901-1905.
755 doi:10.1002/etc.5620190726
- 756 83. Stevenson JH. The acute toxicity of unformulated pesticides to worker honey bees
757 (*Apis mellifera* L.). *Pl. Path.* 1978; 27: 38-40. doi:10.1111/j.1365-
758 3059.1978.tb01070.x
- 759 84. Devillers J. Acute toxicity of pesticides to honey bees, In: Devillers J, Pham-Delègue
760 M. H, editors. *Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals*. London:
761 Taylor & Francis e-Library; 2002. pp. 56-66.
- 762 85. Gradish AE, Scott-Dupree CD, Cutler GC. Susceptibility of *Megachile rotundata* to
763 insecticides used in wild blueberry production in Atlantic Canada. *J. Pest. Sci.* 2012;
764 85: 133-149. doi:10.1007/s10340-011-0391-0
- 765 86. Gradish AE, Scott-Dupree CD, Frewin AJ, Cutler GC. Recommended for wild
766 blueberry on the pollinator *Bombus impatiens*. *Can. Entomol.* 2012; 144: 478-486.
767 doi:10.4039/tce.2012.40
- 768 87. Ahmad Z, Johansen C. Selective toxicity of carbophenothion and trichlorfon to the
769 honey bee and the alfalfa leafcutting bee. *Environ. Entomol.* 1973; 2(1): 27-30.
770 doi:10.1093/ee/2.1.27
- 771 88. Yu SJ. Biochemical defense capacity in the spined soldier bug (*Podisus maculiventris*)
772 and its lepidopterous prey. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1987; 28: 216-223.
773 doi:10.1016/0048-3575(87)90020-4

- 774 89. Oliveira EE, Aguiar RWS, Sarmento RA, Tuelher E, Guedes RNC. Seletividade de
775 inseticidas a *Theocolax elegans* parasitóide de *Sitophilus zeamais*. Biosci. J. 2002;
776 18(2): 11-16.
- 777 90. Moraes SS, Bautista ARL, Viana BF. Avaliação da toxicidade aguda (DL₅₀ e CL₅₀) de
778 inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): via de contato.
779 An. Soc. Entomol. Brasil. 2000; 29(1): 31-37. doi:10.1590/S0301-
780 80592000000100004
- 781 91. Johansen CA. Toxicity of field-weathered insecticide residues to four kinds of
782 bees. Environ. Entomol. 1972; 1(3): 393-394. doi:10.1093/ee/1.3.393
- 783 92. Pettis JS, Delaplane KS. Coordinated responses to honey bee decline in the USA.
784 Apidologie. 2010; 41: 256-263. doi:10.1051/apido/2010013
- 785 93. Goulson D, Nicholls E, Botías C, Rotheray EL. Bee declines driven by combined stress
786 from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science. 2015; 347(6229): 1255957.
787 doi:10.1126/science.1255957
- 788 94. Roubos CR, Rodriguez-Saona C, Isaacs R. Mitigating the effects of insecticides on
789 arthropod biological control at field and landscape scales. Biol. Control. 2014; 75: 28-
790 38. doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.01.006
- 791 95. Morales-Rodriguez A, Peck DC. Synergies between biological and neonicotinoid
792 insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and
793 *Popillia japonica*. Biol. Control. 2009; 51(1): 169-180. doi:
794 10.1016/j.biocontrol.2009.06.008
- 795 96. Xavier VM., Message, Dejair, Picanco MC., Bacci, L, Silva GA, et al. Impact of
796 Botanical Insecticides on Indigenous Stingless Bees (Hymenoptera:
797 Apidae). Sociobiology. 2010; 56(3): 713-725.

- 798 97. Nocelli RCF, Malaspina O, Carvalho SM, Lourenço CT, Roat TC, Pereira AM, et al.
799 As abelhas e os defensivos agrícolas, In: Imperatriz-Fonseca VL, Canhos DAL,
800 Saraiva AM, Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a
801 biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. São Paulo:
802 EDUSP; 2011. pp. 285-300.
- 803 98. Decourtye A, Henry M, Desneux N. Overhaul pesticide testing on bees. *Nature*. 2013;
804 497(7448): 188-188. doi:10.1038/497188a
- 805 99. Arena M, Sgolastra F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides.
806 *Ecotoxicology*. 2014; 23(3): 324-334. doi:10.1007/s10646-014-1190-1

ANEXOS

Normas de Publicação Periódico PLoS ONE

Submission Guidelines Style and Format

File format: Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF, or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected. LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. [Read the LaTeX guidelines.](#)

Length: Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information. We encourage you to present and discuss your findings concisely.

Font: Use any standard font and a standard font size.

Headings: Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

Layout: Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.

Page and line numbers: Include page numbers and line numbers in the manuscript file.

Footnotes: Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.

Language: Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. [Read the supporting information guidelines.](#)

Abbreviations: Define abbreviations upon first appearance in the text. Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. Keep abbreviations to a minimum.

Reference style: PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the [ICMJE sample references. See reference formatting examples and additional instructions below.](#)

Equations: We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor is acceptable. Avoid using MathType or Equation Editor to insert single variables (e.g., \mathcal{A} or Qz) in running text. Wherever possible, single symbols should be inserted as normal text with the correct Unicode (hex) values. Do not use MathType or Equation Editor for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.

Nomenclature: Use correct and established nomenclature wherever possible. *Units of measurement* Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units. *Drugs* Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN). *Species names* Write in italics (e.g., *Homo sapiens*). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., *H. sapiens*). *Genes, mutations, genotypes, and alleles* Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).

Manuscript Organization

Manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below the list.

Beginning section	<i>The following elements are required, in order:</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Title page: List title, authors, and affiliations as first page of manuscript • Abstract • Introduction
Middle section	<i>The following elements can be renamed as needed and presented in any order:</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Materials and Methods • Results • Discussion • Conclusions (optional)
Ending section	<i>The following elements are required, in order:</i>
	<ul style="list-style-type: none"> • Acknowledgments • References • Supporting Information Captions (if applicable)
Other elements	<ul style="list-style-type: none"> • Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately. • Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited. • Supporting information files are uploaded separately.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of Cigarette Smoke Exposure on Innate Immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> Model Solar Drinking Water Disinfection (SODIS) to Reduce Childhood Diarrhoea in Rural Bolivia: A Cluster-Randomized, Controlled Trial
Short title	50 characters	State the topic of the study	Cigarette Smoke Exposure and Innate Immunity SODIS and Childhood Diarrhoea

Titles should be written in title case (all words capitalized except articles, prepositions, and conjunctions). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list

Who belongs on the author list

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the authorship policy. [Read the policy.](#)

Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. [Read more about Acknowledgments.](#)

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation.

Corresponding author

One corresponding author should be designated in the submission system as well as on the title page. One corresponding author should be designated in the submission system. However, this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include the consortium or group name in the author list, and include the full list of members in the Acknowledgments or in a Supporting Information file. The corresponding author is responsible for making sure all authors approve the final manuscript before submission. *PLOS ONE* will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system. The length limit is 1 page.

The cover letter should include the following information:

- Summarize the study's contribution to the scientific literature
- Relate the study to previously published work
- Specify the type of article (for example, research article, systematic review, meta-analysis, clinical trial)
- Describe any prior interactions with PLOS regarding the submitted manuscript
- Suggest appropriate Academic Editors to handle your manuscript ([see the full list of Academic Editors](#))
- List any opposed reviewers

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should:

- Describe the main objective(s) of the study
- Explain how the study was done, including any model organisms used, without methodological detail
- Summarize the most important results and their significance
- Not exceed 300 words

Abstracts should not include:

- Citations
- Abbreviations, if possible

Introduction

The introduction should:

- Provide background that puts the manuscript into context and allows readers outside the field to understand the purpose and significance of the study
- Define the problem addressed and why it is important
- Include a brief review of the key literature
- Note any relevant controversies or disagreements in the field
- Conclude with a brief statement of the overall aim of the work and a comment about whether that aim was achieved

Materials and Methods

The Materials and Methods section should provide enough detail to allow suitably skilled investigators to fully replicate your study. Specific information and/or protocols for new methods should be included in detail. If materials, methods, and protocols are well established, authors may cite articles where those protocols are described in detail, but the submission should include sufficient information to be understood independent of these references.

We encourage authors to submit detailed protocols for newer or less well-established methods as Supporting Information. [Read the Supporting Information guidelines.](#)

Human or animal subjects and/or tissue or field sampling

Methods sections describing research using human or animal subjects and/or tissue or field sampling must include required ethics statements. [See the reporting guidelines for human research, clinical trials, animal research, and observational and field studies for more information.](#)

Data

Methods sections of manuscripts using data that should be deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers and version numbers, if appropriate. Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use.

If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication.

[A list of recommended repositories for different types of data can be found here.](#)

Cell lines

Methods sections describing research using cell lines must state the origin of the cell lines used. [See the reporting guidelines for cell line research for more information.](#)

New taxon names

Methods sections of manuscripts adding new taxon names to the literature must follow the [reporting guidelines below for a new zoological taxon, botanical taxon, or fungal taxon.](#)

Results, Discussion, Conclusions

These sections may all be separate, or may be combined to create a mixed Results/Discussion section (commonly labeled “Results and Discussion”) or a mixed Discussion/Conclusions section (commonly labeled “Discussion”). These sections may be further divided into subsections, each with a concise subheading, as appropriate. These sections have no word limit, but the language should be clear and concise.

Together, these sections should describe the results of the experiments, the interpretation of these results, and the conclusions that can be drawn.

Authors should explain how the results relate to the hypothesis presented as the basis of the study and provide a succinct explanation of the implications of the findings, particularly in relation to previous related studies and potential future directions for research.

PLOS ONE editorial decisions do not rely on perceived significance or impact, so authors should avoid overstating their conclusions. See the [PLOS ONE Criteria for Publication](#) for more information.

copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author, and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like “scientific editing service” or “manuscript editing service.”

Submissions are not copyedited before publication.

Submissions that do not meet the [PLOS ONE publication criterion for language standards](#) may be rejected.

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution. Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the online submission system.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on pre-print servers, if the manuscript is submitted to a journal and also publicly available as a pre-print

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts or author summaries.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format
Published articles	Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). Genet Mol Res. 2011;10: 1576-1588. Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. Mol Immunol. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005 <i>Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.</i>
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute “In press” for page numbers or DOI.
Web sites or online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. Global Health. 2005;1: 14. Available: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14 .
Books	Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. AIDS and the historian. Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity; 1991. Preprint. Available: arXiv:1403.3301v1. Accessed 17 March 2014.
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. The New York Times. 29 Jan 2014. Available: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html . Accessed 17 March 2014.
New media (blogs, web sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013. Database: figshare [Internet]. Accessed: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214 .
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting Information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All Supporting Information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 10 MB in size. Authors may use almost any description as the item name for a Supporting Information file as long as it contains an “S” and number. For example, “S1 Appendix” and “S2 Appendix,” “S1 Table” and “S2 Table,” and so forth. Supporting files should be publication-ready, as they are not copyedited.

Supporting Information captions

List Supporting Information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite Supporting Information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite Supporting Information in the text, citations do not need to be in numerical order.

Read the [Supporting Information guidelines](#) for more details about submitting Supporting Information and multimedia files.

Figures and tables

Figures

Do not include figures in the main manuscript file. Each figure must be prepared and submitted as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Read the [guidelines for figures](#).

Figure captions

Figure captions must be inserted in the text of the manuscript, immediately following the paragraph in which the figure is first cited (read order). Do not include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and “Figure” abbreviated to “Fig” (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded

at submission (e.g. a figure citation of “Fig 1” must refer to a figure file named “Fig1.tif”).

- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

Read more about figure captions.

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file. Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files. Tables require a label (e.g., “Table 1”) and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.