

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE
DOUTORADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

JENIFER DIAS RAMOS

**POTENCIAIS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A FUNGICIDAS AGRÍCOLAS PARA
ABELHAS-SEM-FERRÃO IMATURAS:
CONSERVAÇÃO DE POLINIZADORES E POLÍTICAS PÚBLICAS**

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

**POTENCIAIS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A FUNGICIDAS AGRÍCOLAS PARA
ABELHAS-SEM-FERRÃO IMATURAS:
CONSERVAÇÃO DE POLINIZADORES E POLÍTICAS PÚBLICAS**

Jenifer Dias Ramos

TESE DE DOUTORADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429

Fone: (051) 3320-3500

CEP 90619-900 Porto Alegre - RS

Brasil

2021

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

**POTENCIAIS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A FUNGICIDAS AGRÍCOLAS PARA
ABELHAS-SEM-FERRÃO IMATURAS:
CONSERVAÇÃO DE POLINIZADORES E POLÍTICAS PÚBLICAS**

Me. Jenifer Dias Ramos
Orientadora: Profa. Dra. Betina Blochtein
Coorientadora: Profa. Dra. Gabriela Coelho-de-Souza

TESE DE DOUTORADO
PORTO ALEGRE – RS - BRASIL

2021

Banca Examinadora

Profa. Dra. Guendalina Turcato Oliveira

Profa. Dra. Monica Vianna

Profa. Dra. Roberta Nocelli

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
MANUSCRITO 1	19
Fungicida utilizado para controlar doenças vegetais causa letalidade para a abelha-sem-ferrão <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	19
MANUSCRITO 2	36
Dose intermediária de Piraclostrobina é letal para larvas da abelha-sem-ferrão <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	36
MANUSCRITO 3	55
A systemic fungicide distort the male genitalia of a stingless bee species	55
MANUSCRITO 4	72
Política brasileira para o serviço ecossistêmico de polinização: entre a reformulação da legislação de agrotóxicos e a soberania alimentar	73
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Janine e Francisco, que sempre apoiaram minhas escolhas e me proporcionaram todas as oportunidades de estudar e crescer ao longo dessa caminhada, mesmo quando essa trajetória acadêmica nunca lhes foi oportunizada ou vivenciada. A eles que me deram todo carinho e amor necessários nos momentos alegres e me acolheram nos momentos difíceis e cansativos. Obrigada pelo apoio, pelo amor, pelo exemplo de força, coragem e resiliência que são para mim.

Ao meu irmão, Francisco, por seu apoio, acolhimento e amor incondicionais.

À minha família, pelo amor e carinho em todos os momentos, e pela atenção em tentar entender meu projeto de pesquisa. Agradeço especialmente à minha avó Marlene, por ser meu porto seguro e me acolher nos momentos de choro e cansaço, por me dar o “colo” que acalma meu coração, por me dar forças para voltar e continuar tentando, e por me dar o amor mais nobre e incondicional que eu conheço.

À minha orientadora, Dra. Betina Blochtein, por aceitar a orientação deste trabalho e por estes mais de dez anos juntas. Obrigada pela paciência, pelo carinho, estímulo, inspiração de mulher pesquisadora e acima de tudo pela amizade e respeito que construímos juntas ao longo destes anos.

À minha coorientadora, Dra. Gabriela Coelho-de-Souza, com quem aprendi sobre transversalidades na Ciência, aplicabilidade da mesma, extensão rural, soberania alimentar e pensar em rede.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Entomologia, por compartilhar informações e conhecimentos. Obrigada, pelo apoio e pelos momentos de descontração entre um café e outro. Obrigada especialmente aos colegas Andresa Dornelles, por toda a inspiração e iniciação nesta área do conhecimento, ao Charles Fernando dos Santos por todas as indagações, conversas, reflexões e apoio estatístico, e a Rosana Halinski por me acompanhar e inserir no mundo das abelhas desde a graduação.

Aos “meus” bolsistas de iniciação científica com quem tive o prazer de compartilhar e partilhar experiências científicas e pessoais: Alex Otesbelgue, Cristiane de Barros, Patrick Souza, Ana Gabriela Vargas, Luisa Cristmann e Isabelle Wrague, obrigada por participarem do meu processo de construção do conhecimento e me permitirem fazer parte do de vocês a partir de nossas discussões tão ricas e acolhedoras.

A minha colega de profissão e amiga Annelise Rosa-Fontana, por sua escuta ativa, por todas as trocas de informações e incentivos no mundo da pesquisa.

À minha segunda família, do Ciência sem Fronteiras, que construí durante um intercâmbio na graduação e que acompanham ativamente a minha caminhada. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo amor e carinho mesmo com os milhares quilômetros de distância. Obrigada por todas as vezes que me ouviram e me deram forças para continuar, que confiaram e acreditaram em mim.

As membras e membros da ONG Contraponto, onde aprendo muito e compartilhei tantas perspectivas sobre problemas sociais e política.

As minhas amigas, Fabíola Carvalho, Taciana Barcellos e Júlia Lima com quem aprendi que o que sinto é legítimo e que a síndrome da impostora nos atravessa enquanto pesquisadoras, mas somos mais fortes que isso e lutaremos sempre juntas.

As minhas amigas Fernanda Tussi, Fernanda Rauber, Luana Zinn, Paula Ott, Andreia Rosa, Eliandra Cerutti, por fazerem do caos acolhida, fortaleza e me ensinarem o real significado de sororidade.

A minha amiga Gabriela Perin, que em todo esse processo foi empatia, foi acolhida, foi compreensão, foi incentivo, foi elogio, foi força e me mostrou inúmeras vezes que eu era capaz.

A minha amiga Jessica Costa, que me acompanha nessa jornada há quase duas décadas e foi meu incentivo e choque de realidade em todas as fases da minha vida.

As minhas amigas Tais Nascimento, Gabrielle Gomes, Naiana Pavanelo, Emillin Basegio e Bárbara Cardoso por me ensinarem a ter amigas e parceiras.

Ao meu amigo confidente, conselheiro, indicador de realidades e elogios Rodrigo Vargas que por várias vezes fez os feedbacks mais honestos que eu poderia receber e não deixou eu me sabotar.

Ao meu amigo Cristiano Santos por expandir as perspectivas da minha forma de pensar sempre de forma tão gentil.

A todas professoras, professores e estudantes do programa de pós-graduação de Ecologia e Evolução da Biodiversidade da PUCRS, por fazerem parte ativa e efetiva da minha

formação acadêmica e pessoal. A Patrícia Baptista, secretária do programa, por resolver e tirar dúvidas sobre todas as minhas demandas.

Ao meus alunos, alunas e alunes que desde 2019 me desafiam a refletir para além da academia.

A todos os agricultores e as agricultoras que participaram direta ou indiretamente deste processo de doutoramento.

A CAPES pelo fomento desta bolsa de doutorado que viabilizou a minha dedicação à pesquisa brasileira.

As abelhas que são meu objeto de estudo e os seres vivos com quem aprendo a cada comportamento.

A todas, todos e todes que fizeram parte direta ou indiretamente deste processo de doutoramento do qual tenho muito orgulho de concluir, mas acima de tudo de ter podido aprender e crescer a cada fase dele.

Dedico essa tese a todas as mulheres cientistas que me inspiram, a todas aquelas que lutaram para eu poder ocupar este espaço que eu ocupo hoje e por último, mas não menos importante, a minha rede de apoio de mulheres guerreiras que fazem desta caminhada um processo de constante aprendizado.

“LA REVOLUCION SERA FEMINISTA O NO SERÁ”

Karina Andrea Bidaseca

RESUMO GERAL

As abelhas são responsáveis pela polinização de 80% das plantas cultivadas ou silvestres, sendo polinizadores exclusivos de 65% delas. A agricultura mundial tem evoluído muito nos últimos anos com o uso de múltiplas tecnologias como drones e inteligência artificial. Porém, ela é ainda muito dependente de produtos controversos como os agrotóxicos. Estes produtos protegem as plantas de pragas e doenças, mas podem causar efeitos secundários na biodiversidade silvestre de polinizadores, como as abelhas, das quais muitas culturas agrícolas dependem em algum nível. Até mesmo a ação de produtos considerados não prejudiciais às abelhas, como fungicidas e herbicidas, estão sendo questionados ultimamente pois a exposição desde abelhas adultos à alimentação provida aos imaturos parece prejudicar esses insetos. Diante disso, este trabalho objetivou avaliar os efeitos da exposição crônica, via oral e tópica, dos fungicidas agrícolas Mancozebe e Piraclostrobina para operárias imaturas de abelhas-sem-ferrão, utilizando como modelo experimental *Scaptotrigona bipunctata*. Também foi avaliado a associação do fungicida Carbendazim com o inseticida Clorpirifós em machos imaturos desta mesma espécie. As abelhas foram expostas a diferentes doses do fungicida (produto comercial), calculadas a partir da dose de campo indicada para culturas de citros. Para o ingrediente ativo Mancozebe utilizou-se: a) 1,545 ng; b) 2,175 ng; c) 41,29 ng; d) 45,71 ng; e) 960 ng de ia / μ L de dieta) e um controle sem fungicida. Para Piraclostrobina utilizou-se: a) $1,30 \times 10^{-4}$ μ l; b) $3,25 \times 10^{-3}$ μ l e c) $6,5 \times 10^{-3}$ de μ l i.a./larva. O efeito do fungicida foi avaliado por meio de curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e Anova de um fator. Nossos resultados indicam uma curva dose-dependente para o fungicida Mancozebe, e para a Piraclostrobina observou-se que a dose intermediária foi 3,6 vezes mais letal às abelhas jovens quando comparadas às outras doses testadas. Ao observarmos as abelhas sobreviventes destaca-se que ambos os produtos causaram deformações nas asas e abdômen dos indivíduos. Para verificar os efeitos da exposição ao fungicida e inseticida nos machos, avaliou-se a partir de morfometria geométrica potenciais alterações na genitália. Detectamos uma diferença significativa na forma da genitália dos machos expostos. Com isso, nosso trabalho traz evidências dos efeitos causados por fungicidas agrícolas aos imaturos de abelhas-sem-ferrão. Portanto, é questionável a sua indicação como produto não-prejudicial às abelhas. Além disso, recomenda-se deixar claro que o efeito positivo no combate a doenças fúngicas pode

adversamente comprometer a polinização das culturas dependentes desse serviço ecossistêmico.

Palavras-chave: polinização, agrotóxicos, avaliação de risco, mancozebe, piraclostrobina, carbendazim, políticas públicas.

ABSTRACT

Bees are responsible for the pollination of 80% of cultivated or wild plants, being exclusive pollinators of 65% of them. World agriculture has evolved a lot in recent years with the use of multiple technologies such as drones and artificial intelligence. However, it is still very dependent on controversial products such as pesticides. These products protect plants from pests and diseases, but can cause indirect effects on wild biodiversity from pollinators such as bees, on which many agricultural crops depend to some degree. Even the action of products considered not harmful to bees, such as fungicides and herbicides, are being questioned lately because the exposure of adult bees to the food provided to the immature ones seems to harm these insects. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of chronic exposure, oral and topical, of agricultural fungicides Mancozebe and Pyraclostrobin on immature workers of stingless bees, using as an experimental model *Scaptotrigona bipunctata*. The association of the fungicide Carbendazim with the insecticide Chlorpyrifos in immature males of the same species was also evaluated. The bees were exposed to different doses of the fungicide (commercial product), calculated from the field dose indicated for citrus crops. For the active ingredient Mancozeb were used: a) 1.545 ng; b) 2.175 ng; c) 41.29 ng; d) 45.71 ng; e) 960 ng ai/ μ L of diet) and a control without fungicide. For Pyraclostrobin were used: a) 1.30×10^{-4} μ l; b) 3.25×10^{-3} μ l and c) 6.5×10^{-3} μ l a.i./larva. The effect of the fungicide was evaluated using Kaplan-Meier and one-way Anova survival curves. Our results indicate a dose-dependent curve for the fungicide Mancozebe, and for Pyraclostrobin it was observed that the intermediate dose was 3.6 times more lethal to young bees when compared to the other doses tested. When observing the surviving bees, it is highlighted that both products caused deformations in the individuals wings and abdomen. To verify the effects of exposure to the fungicide and insecticide in males, potential changes in the genitalia were evaluated using geometric morphometry. We detected a significant difference

in the shape of the exposed males genitalia. Thus, our work brings evidence of the effects caused by agricultural fungicides on immature stingless bees. Therefore, its indication as a non-harmful product to bees is questionable. In addition, it is recommended to clarify that the positive effect in combating fungal diseases can adversely affect the pollination of crops dependent on this ecosystem service.

Keywords: pollination, pesticides, risk assessment, mancozeb, pyraclostrobin, carbendazim, public policies.

INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas são responsáveis pela polinização de 80% das plantas cultivadas ou silvestres, sendo polinizadores exclusivos de 65% delas (WOLOWSKI et al., 2018; IBPES, 2019). Numerosos são os trabalhos que atribuíram valores ao serviço ecossistêmico de polinização (COSTANZA et al., 1997; GALLAI et al., 2009; HANLEY et al., 2015; GIANINI et al., 2015a), com estimativas recentes que referem 235 a 577 bilhões de dólares/ano (IPBES, 2019). No Brasil, os valores anuais se aproximam de 43 bilhões de reais, o que representa a renda total das culturas dependentes de polinizadores (GIANNINI et al., 2015a).

Na agricultura, as abelhas sem ferrão destacam-se como o grupo de polinizadores mais importantes, sendo os mais adaptados e eficientes, coexistindo numa dependência entre as espécies de plantas (FREITAS et al., 2015). O Brasil apresenta a maior diversidade de espécies de abelhas-sem-ferrão (MICHENER, 2007; PEDRO, 2014), as quais podem ser implementadas como uma alternativa promissora à *Apis mellifera* na polinização em diferentes culturas agrícolas (SILVA; PACHECO FILHO; FREITAS, 2015).

Contudo, a degradação e fragmentação de habitats naturais, associada a contínua expansão de monoculturas, frente ao modelo agrícola vigente, que leva a escassez da diversidade de recursos florais e o uso de agrotóxicos, vem prejudicando as populações de abelhas (GOULSON et al., 2015). Os riscos se aplicam para além da espécie exótica manejada *A. mellifera*, mas também às espécies nativas (van der VALK et al., 2012). O contato com os agrotóxicos ocorre durante as atividades diárias de coleta de pólen e néctar, realizadas pelas abelhas forrageiras, levando esses recursos até a colônia, os quais podem conter resíduos destes insumos agrícolas. O pólen e néctar são utilizados para produção do alimento que será ingerido pelas abelhas adultas e larvas (ZHU et al., 2014; BEYER et al., 2018).

Atualmente, existe uma farta literatura sobre toxicidade de inseticidas para as abelhas (CARVALHO et al., 2009; PALMER et al., 2013; SILVA et al., 2015; ROSA et al., 2016; dos SANTOS et al., 2016; DIVELY et al., 2017; ARAÚJO et al., 2017; ARAÚJO, 2018; TADEI et al., 2019; WANG et al., 2020). Nestes estudos, *A. mellifera* é a espécie utilizada como principal modelo experimental devido a sua ampla distribuição geográfica, reconhecido papel como polinizadora global, conhecimento amplo sobre seu ciclo biológico e da possibilidade de

manejo em laboratório. Desta forma, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) se baseia nos testes com *A. mellifera* para realizar a avaliação de risco ambiental de agrotóxicos. Entretanto, há um movimento internacional e nacional por parte dos cientistas que visa incluir também as espécies nativas em avaliações de risco, entendendo que a sensibilidade em relação ao efeito dos agrotóxicos varia entre as espécies. Dentre estas espécies destaca-se a *Scaptotrigona bipunctata*, popularmente conhecida como tubuna, com ampla distribuição geográfica pelo Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru (CAMARGO et al., 2013), esta espécie constitui ninhos populosos sendo potencial polinizadora de culturas agrícolas e é reconhecida pela produção de mel e pólen. Em 2018, o IBAMA publicou o documento intitulado "Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos", em que a tubuna aparece listada entre as 20 espécies indicadas como prioritárias para avaliação de risco (PIRES e TOREZANI, 2018).

Além dos inseticidas, outra classe de agrotóxico, amplamente utilizado na agricultura é a dos fungicidas. Todavia, os estudos sobre avaliação de risco utilizando estes produtos não apresentaram o mesmo crescimento nas últimas décadas quanto os inseticidas (WOOD; GOULSON, 2017; CULLEN et al., 2019), embora em algumas culturas agrícolas e no seu entorno, os fungicidas tenham sido encontrados em maior quantidade que os inseticidas (PETTIS et al., 2013; PARK et al., 2015; DAVID et al., 2016; TRAYNOR et al., 2021). Adicionalmente, o risco da exposição das abelhas aos fungicidas é aumentado em condições de campo, uma vez que parte significativa destes produtos têm permissão de aplicação nos períodos de floração das culturas agrícolas, o que torna preocupante a escassez de estudos do efeito dos fungicidas em abelhas.

Além disso, é sabido a relação benéfica entre os microrganismos e os insetos sociais, uma vez que os ninhos desses insetos fornecem condições ambientais estáveis e alimento para os microrganismos (KALTENPOTH e ENGL, 2014), os quais, por sua vez, proporcionam diversos benefícios para seus hospedeiros como nutrientes e proteção contra patógenos (VAN BAEL, 2011). Recentemente, estudos de Menezes (2015), Paludo (2018) e seus colaboradores identificaram uma relação simbiótica entre o fungo (*Zygosaccharomyces* sp.) e abelhas sociais, nomeadamente a *Scaptotrigona depilis*, este fungo fornece precursores de esteróides essenciais para o desenvolvimento da abelha (PALUDO et al., 2018). Diante destas

descobertas, estudos sobre a toxicidade dos fungicidas se fazem essenciais, visto o impacto que podem causar nos simbiossiontes das abelhas sem ferrão.

Frente ao contexto de avaliação de risco no Brasil, destaca-se que em 2017 foi sancionada e publicada a Instrução Normativa nº 2 do IBAMA, cujo objetivo é estabelecer diretrizes, requisitos e procedimentos para a avaliação dos riscos de ingrediente(s) ativo(s) de agrotóxico(s) para insetos polinizadores, utilizando-se as abelhas como organismos indicadores. Tal instrução exige das empresas solicitantes uma série de estudos acerca dos efeitos dos produtos sobre a reprodução, o desenvolvimento e a sobrevivência das abelhas.

A efetividade do conjunto de regulamentações e políticas que abarcam polinizadores e o serviço ecossistêmico de polinização ainda não foram adequadamente monitoradas e retroalimentadas a fim de ajustar possíveis gargalos destas regulamentações. Dentre os quais, destacamos a avaliação de toxicidade dos agrotóxicos nas abelhas sem ferrão, para diferentes classes de produtos, bem como para efeitos letais e subletais. O decreto nº 5.981 de 2006 (BRASIL, 2006) dispõe sobre testes ecotoxicológicos em organismos terrestres, entre eles abelhas adultas e em larvas (portaria IBAMA nº 84/1996, instrução normativa nº 2/2017 - BRASIL, 2017), os quais devem ser realizados para avaliação de risco de um agrotóxico a ser registrado. Porém, os parâmetros observados são apenas a mortalidade (DL50) após um curto período de exposição (até 96 horas) (CHAM et al., 2017). No entanto, os efeitos aos agrotóxicos podem surgir após 96h, portanto, não seriam notados nas fases regulatórias desse registro (CHAM et al., 2017).

É diante deste cenário que este trabalho se propôs a contribuir na produção de dados primários sobre os efeitos da exposição crônica a fungicidas agrícolas para operárias imaturas de *Scaptotrigona bipunctata*. E na tentativa de representar a realidade do campo, utilizamos a dose de campo dos fungicidas, aplicada na cultura de *Citrus* sp., como base para calcular as doses de exposição para as abelhas.

No Brasil, os cítricos ocupam lugar de destaque dentre as diversas culturas agrícolas, devido ao seu grande valor de exportação e à sua importância social ao gerar empregos possibilitando a sucessão rural e a manutenção da juventude no campo (EVANGELISTA-RODRIGUES, 2019). E neste contexto, a polinização por abelhas favorece a qualidade do fruto, agregando valor econômico ao produto (NASCIMENTO et al., 2011; MALERBO e HALAK, 2013).

Para avaliar os efeitos dos agrotóxicos em abelhas sem ferrão imaturas observamos a sobrevivência, peso, medidas morfológicas e morfométricas destes indivíduos. Por fim, este trabalho se propôs a uma reflexão crítica sobre o tema agrotóxicos e sua interface com as políticas públicas, tendo em vista o cenário político-econômico e ambiental em que essa tese se desenvolveu.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W. L.; GODOY, M. S.; MARACAJÁ, P. B.; MEDEIROS, A. C.; CARLOS, A. D.; SILVEIRA, D. C.; MEDEIROS, A. P.; PAIVA, A. C. Toxic effects of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. workers (Hymenoptera: Apidae). **International Journal of Development Research**, v.8, n.05, p.20608-20612, 2018. Disponível em: <<https://www.journalijdr.com/toxic-effects-neonicotinoids-apis-mellifera-l-workers-hymenoptera-apidae>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ARAÚJO, W. L.; GODOY, M. S.; MARACAJÁ, P. B.; COELHO, W. A. C.; SILVA, B. K. A.; RUGAMA, A. J. M.; ARAÚJO, E. L.; BATISTA, J. L. Toxicity of neonicotinoids used in melon culture towards *Apis mellifera* L. **African Journal of Agricultural Research**, v.12, n.14, p.1204-1208, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11843>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BEYER, M.; LENOUEVEL, A.; GUIGNARD, C.; EICKERMANN, M.; CLERMONT, A.; KRAUS, F.; HOFFMANN, L. Pesticide residue profiles in bee bread and pollen samples and the survival of honeybee colonies—a case study from Luxembourg. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 32163–32177, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-018-3187-4>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BRASIL. Decreto nº 5.981, de 6 de dezembro de 2006. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, ano 143, n. 234, p. 13-15, 7 dez. 2006. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=07/12/2006&jornal=1&pagina=13&totalArquivos=128>>. Acesso em: 05 jul 2021.

BRASIL. Instrução Normativa nº 2, de 9 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, ano 154, n. 33, p. 33-36, 10 fev. 2017. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=10/02/2017&jornal=1&pagina=33&totalArquivos=88>>. Acesso em: 05 jul 2021.

BRASIL. Portaria Normativa nº 84, de 15 de outubro de 1996. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, ano 134, n. 203, p. 21358-21366, 18 out. 1996. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/10/1996&jornal=1&pagina=102&totalArquivos=120>>. Acesso em: 05 jul 2021.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**

- **online version**. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 10 ago 2021.

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, C. F.; BUENO FILHO, J. S. S.; BAPTISTA, A. P. M. Toxicidade de acaricidas/ inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 597-606, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p5972009>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CHAM, K.O.; NOCELLI, R.C.F.; BORGES, L.O.; VIANA-SILVA, F.E.C.; TONELLI, C.A.M.; MALASPINA, O. et al. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. **Environmental Entomology**, v. 20, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/ee/nvy137>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R. V.; PARUELO, J.; RASKIN, R. G.; SUTTON, P.; van den BELT, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, p. 253-260, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/387253a0>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CULLEN, M. G.; THOMPSON, L. J.; CAROLAN, J. C.; STOUT, J. C.; STANLEY, D. A. Fungicides, herbicides and bees: a systematic review of existing research and methods. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. 1-17, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225743>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DAVID, A.; BOTÍAS, C.; ABDUL-SADA, A.; NICHOLLS, E.; ROTHERAY, E. L.; HILL, E. M.; GOULSON, D. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. **Environment International**, v. 88, p. 169-178, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.011>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DIVELY, G.P; EMBREY, M.S; KAMEL, A.; HAWTHORNE, D.J; PETTIS, J.S. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. **PLoS One**, p 3-10, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118748>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A. Polinização de Citrus. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/69189/1/Adriana.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

FREITAS, B. M.; SILVA, C. I. O papel dos polinizadores na produção agrícola no Brasil. *In: Agricultura e Polinizadores*. 1 ed. São Paulo: A.B.E.L.H.A. – Associação Brasileira de Estudos das abelhas, 2015. 71 p. Disponível em: <<https://www.abelha.org.br/publicacoes/ebooks/Agricultura-e-Polinizacao.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZFONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil.

Journal of Economic Entomology, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jee/article-abstract/108/3/849/2380009?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1-16, 2015. Disponível em: <http://doi.org/10.1126/science.1255957>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

HANLEY, N.; BREEZE, T. D.; ELLIS, C.; GOULSON, D. Measuring the economic value of pollination services: Principles, evidence and knowledge gaps. **Ecosystem Services**, v. 14, p. 124-132, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2014.09.013>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES – IPBES. **Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production**. Bonn, Germany, 2016. 40 p. <https://ipbes.net/sites/default/files/spm_deliverable_3a_pollination_20170222.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES – IPBES. **Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production**. Bonn, Germany, 2019. 56 p. <<https://doi.org/10.5281/zenodo.3553579>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

KALTENPOTH, Martin; ENGL, Tobias. Defensive microbial symbionts in Hymenoptera. **Functional Ecology**, v. 28, n. 2, p. 315-327, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1365-2435.12089>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MALERBO-SOUZA, D. T. e HALAK, A. L. Efeito da interação abelha-flor na produção de frutos em cultura de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Zootecnia Tropical**, v. 31, p.78-93, 2013.

MICHENER, C. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. 953 p.

NASCIMENTO, E. T.; PÉREZ-MALUF, R.; GUIMARÃES, R. A.; CASTELLANI, M. A. Diversidade de abelhas visitantes em flores de Citrus em pomares de laranjeira e tangerineira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, p.111-117, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-29452011005000048>>. Acesso: 10 ago. 2021.

PALMER, M. J.; MOFFAT, C.; SARANZEWA, N.; HARVEY, J.; WRIGHT, G. A.; CONNOLLY, C. N. Cholinergic pesticides cause mushroom body neuronal inactivation in honeybees. **Nature Communications**. v.4, n.4, p.1634-1642, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncomms2648>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PARK, M. G.; BLITZER, E. J.; GIBBS, J.; LOSEY, J. E.; DANFORTH, B. N. Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1809, p. 1-9, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0299>>. Acesso em: 10 ago. 2021

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v.61, n. 4, p. 348-354, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; vanENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1-9, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PLATAFORMA BRASILEIRA DE BIODIVERSIDADE E SERVIÇOS ECOSISTÊMICOS – BPBES. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. 1 ed. São Carlos, São Paulo, 2019. 184 p. Disponível em: <<http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PIRES, C. S.; TOREZANI, K.R. **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxico**. Brasília: IBAMA, 2018. 84 p. Disponível: <<http://ibama.gov.br/component/phocadownload/file/4667-selecao-de-especies-de-abelhas-nativas-para-avaliacao-de-risco-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 10 ago 2021.

ROSA, A. S.; TEIXEIRA, J. S. G.; VOLLET-NETO, A.; QUEIROZ, E. P.; BLOCHTEIN, B.; PIRES, C. S. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729–738, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0424-4>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SILVA, C. I.; PACHECO FILHO, A. J. S.; FREITAS, B. M. Polinizadores manejados no Brasil e sua disponibilidade para a agricultura. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Org.). **Agricultura e Polinizadores**. 1. ed. São Paulo: A.B.E.L.H.A, 2015. 71 p. Disponível em: <<https://www.abelha.org.br/publicacoes/ebooks/Agricultura-e-Polinizacao.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SILVA, C. A. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; DOMINGUES, CAIO EDUARDO C.; ABDALLA, FÁBIO C.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Fipronil effect on the frequency of anomalous brood in honeybee reared in vitro. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 450, p. 140, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/161838>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

TRAYNOR, K.S; ROSI, S.; RENNICH, K.; STEINHAEUER, N.; FORSGREN, E.; ROSE. et al. Pesticides in honey bee colonies: Establishing a baseline for real world exposure over seven years in the USA. **Environmental Pollution**, v. 279, p. 116566, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116566>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

van der VALK; KOOMEN, I.; NOCELLI, R. C. F.; RIBEIRO, M. F.; FREITAS, B. M.; CARVALHO, S.; KASINA, J. M.; MARTINS, D.; MUTISO, G.; ODHIAMBO, C.; KINUTHIA, W.; GIKUNGU, M. et al. Aspects determining the risk of pesticides to wild bees: risk profiles for focal crops on three

continents. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 437, p. 142-158, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.5073/jka.2012.437.042>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WANG, Y.; YU, C.; LI, W.. Interaction patterns and combined toxic effects of acetamiprid in combination with seven pesticides on honey bee (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, p. 110100, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110100>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WOOD, T. J.; GOULSON, D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17285-17325, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ZHU, W.; SCHMEHL, D. R.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e77547, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

1. MANUSCRITO 1

#Este manuscrito será submetido para a revista Ecotoxicology

Fungicida utilizado para controlar doenças vegetais causa letalidade para a abelha-sem-ferrão *Scaptotrigona bipunctata*

Jenifer Dias Ramos, Alex Otesbelgue, Cristiane Andrade de Barros, Betina Blochtein

Resumo

As abelhas são consideradas os principais agentes polinizadores. Somente no Brasil, por exemplo, existe cerca de 240 espécies de abelhas sem ferrão que contribuem efetivamente para a manutenção da biodiversidade das angiospermas e para a produção de alimentos local. No entanto, tem sido evidenciado um declínio dessas populações, especialmente das abelhas. Um dos fatores que contribuem para esse declínio é o uso de agrotóxicos. No presente estudo avaliamos os efeitos da exposição crônica ao ingrediente ativo Mancozebe, o fungicida mais comercializado no Brasil, via dieta alimentar, em operárias jovens (não-pigmentadas) de *Scaptotrigona bipunctata*. As abelhas foram expostas a cinco doses diferentes do fungicida, calculadas a partir da dose de campo indicada para culturas de citros: a) 1,545 ng; b) 2,175 ng; c) 41,29 ng; d) 45,71 ng; e) 960 ng de ia / μ L de dieta) e um controle sem fungicida. O efeito do fungicida foi avaliado por meio de curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier e Anova de um fator. Nossos resultados indicam que mesmo doses subletais de Mancozebe foram altamente letais aos imaturos reduzindo drasticamente a probabilidade de sobrevivência e/ou aumentando o período de desenvolvimento larval. Dado o amplo uso do fungicida Mancozebe, indicado para mais de dez culturas agrícolas e seu efeito negativo no desenvolvimento das abelhas em questão, faz-se emergente sua reavaliação, bem como de sua inserção em testes toxicológicos para avaliação de risco de fungicidas agrícolas em organismos não-alvo dos produtos.

Palavras-chave: análise de risco, Unizeb Gold, Meliponini, abelhas silvestres, organismos não-alvo.

Abstract

Bees are considered the main pollinating agents. In Brazil, for example, there are about 240 species of stingless bees that effectively contribute to the maintenance of angiosperm biodiversity and to local food production. As this region also has large extensions of agricultural areas and crops, a synergy between pollinators and agricultural crops was expected. However, there has been evidence of a decline in these populations, especially of bees. One of the factors contributing to this decline is the use of pesticides. In the present study, we evaluated the effects of chronic exposure to the active ingredient Mancozeb, the most commercialized fungicide in Brazil, via diet, in young (non-pigmented) workers of *Scaptotrigona bipunctata*. Bees were exposed to five different doses of the fungicide, calculated from the field rate indicated for citrus crops, (a) 1.545 ng; b) 2.175 ng; c) 41.29 ng; d) 45.71 ng; e) 960 ng ai/ μ L of diet) and a control without fungicide. The effect of the fungicide was evaluated using Kaplan-Meier and one-way Anova survival curves. Our results indicate that even sublethal doses of Mancozeb were highly lethal to immatures, drastically reducing the probability of survival and/or increasing the larval development period. Given the wide use of the Mancozebe fungicide, indicated for more than ten agricultural crops and its negative effect on the development of the bees in question, its re-evaluation is emerging, as well as its inclusion in toxicological tests for risk assessment of agricultural fungicides in organisms non-target products.

Keywords: risk assessments, Unizeb Gold, Meliponini, wild bees, non-target organisms.

Introdução

As abelhas são consideradas os principais polinizadores, contribuindo efetivamente para a manutenção da biodiversidade. A reprodução das angiospermas e a produção de alimentos se deve em grande parte a esse serviço de polinização realizado por elas (Ricketts et al., 2008; Aizen et al., 2009; Lautenbach et al., 2012; Klatt et al., 2013). No Brasil, o valor desse serviço ecossistêmico foi estimado em cerca de 12 bilhões de dólares por ano (Giannini et al., 2015). As abelhas sem ferrão (Meliponini) possuem uma ampla distribuição geográfica nas regiões tropicais (Camargo e Pedro, 2013) e mostram-se excelentes polinizadoras de plantas nativas e cultivadas (Slaa et al., 2006; Torezani, 2015; Freitas et al., 2015; SEM ABELHA SEM ALIMENTO, 2018). No entanto, nos últimos anos, o serviço ecossistêmico de polinização está enfrentando uma diminuição desencadeada devido ao declínio acelerado das populações de abelhas (Brittain et al., 2011; Klatt et al., 2013). Muitos são os fatores que contribuem para esse fenômeno, como mudanças climáticas, perda de habitat, patógenos e uso de agrotóxicos (IPBES, 2019).

Embora sejam organismos filogeneticamente próximos às abelhas-sem-ferrão (Bossert et al., 2019), as abelhas melíferas são exóticas em muitos países, inclusive no Brasil e, mesmo sendo usadas como organismos modelo em análises ecotoxicológicas, elas podem não refletir o que ocorre com as espécies nativas (Rosa et al., 2020). Por exemplo, as abelhas-sem-ferrão apresentam diferentes graus de suscetibilidade aos agrotóxicos quando comparadas às abelhas melíferas (*Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) Hymenoptera: Apidae: Apini), podendo variar também entre as suas diferentes espécies (Dorigo et al., 2019; Jacob et al., 2019;).

Essa suscetibilidade pode ser afetada pelo estágio de desenvolvimento do inseto. Quando as abelhas-sem-ferrão são expostas a agrotóxicos na fase de larva, elas podem apresentar taxas mais elevadas de mortalidade, deformações, comportamentos anormais e até mesmo alteração na determinação de castas (Rosa et al., 2016; dos Santos et al., 2016; Dornelles et al., 2021). Com isso, faz-se necessário que a avaliação de risco de agrotóxicos inclua, além de *A. mellifera*, as abelhas-sem-ferrão como modelo experimental representativo da biodiversidade brasileira (Dorigo et al., 2019; Rosa et al., 2020). Dessa forma, destaca-se a espécie *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier), popularmente conhecida

como tubuna, com ampla distribuição geográfica pelo Brasil, Bolívia, Paraguai e Peru (CAMARGO et al., 2013), esta espécie constitui ninhos populosos sendo potencial polinizadora de culturas agrícolas e é reconhecida pela produção de mel e pólen.

Em ecossistemas agrícolas as abelhas forrageiras estão expostas a agrotóxicos, a exemplo dos fungicidas, que podem ser os exógenos mais detectados em produtos apícolas (Mullin et al., 2010). Esta situação pode estar relacionada à permissão da aplicação de fungicidas durante a floração das culturas, período em que as abelhas forrageiam em busca dos recursos florais (Johnson et al., 2013). Os fungicidas, apesar de não terem os insetos como organismos-alvo, podem causar efeitos letais e subletais a eles. Foi evidenciado que após a exposição aos fungicidas Ziram, Captan e Rovral que nenhuma larva de abelhas melíferas completou o desenvolvimento até a fase adulta (Mussen et al, 2004).

O Mancozebe, assim como o Ziram, é um ditiocarbamato que contém metal e, junto com outros 15 fungicidas, ele foi considerado indutor de alta repelência para *A. mellifera*, consequentemente reduzindo a polinização promovida por estes insetos (Kang et al, 2017). O Mancozebe é um profungicida, pois ele só se torna tóxico quando exposto à água e à luz ultravioleta, liberando respectivamente os compostos tóxicos sulfeto de bisotiocianato de etileno (EBIS) e bisotiocianato de etileno (EBI). Este fungicida não é fitotóxico, pois não é permeável na cutícula e, portanto, não entra no tecido vegetal. O Unizeb Gold (UG) é uma fórmula comercial em que o ingrediente ativo é o Mancozebe. Seu uso é recomendado para 13 culturas, das quais sete são, em algum nível, dependentes da polinização (AGROFIT, 2021). Entre essas, está incluída a cultura dos cítricos. Sabe-se que as flores de laranja doce, *Citrus sinensis* (L.), são atrativas para as abelhas e a polinização leva a uma maior frutificação, maior peso dos frutos e laranjas menos ácidas (Souza et al, 2004). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição crônica ao fungicida Mancozebe, em operárias *Scaptotrigona bipunctata* relacionando à sobrevivência dos imaturos ao longo de seu desenvolvimento larval e à variação na biomassa dos indivíduos sobreviventes.

Materiais e Métodos

Coleta de material e Criação in vitro

Nossos experimentos foram conduzidos entre os meses de dezembro de 2018 e janeiro de 2019. Utilizou-se favos de cria de três colônias de abelhas–sem-ferrão da espécie *Scaptotrigona bipunctata*, mantidas no Meliponário localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (30° 1' 40" S, 51° 13' 43" O).

Em condições de laboratório, foram utilizadas placas de criação de abelhas, as quais continham cavidades com dimensões semelhantes às células de criação de operárias de favos naturais. Para mensurar a quantidade de alimento larval por célula de criação, foram coletadas 20 células/colônia, escolhidas aleatoriamente, e quantificadas. Para cada cavidade, utilizando micropipetas automáticas, foram depositados 35 microlitros de alimento larval coletado em favos recém provisionados pelas operárias em colônias matrizes. Após tal procedimento, foi transferida uma larva de aproximadamente 24h de vida, para cada cavidade, provenientes destas colônias. As placas de criação foram acondicionadas em recipientes herméticos com tampa e mantidas em uma câmara de incubação (BOD) sob condições controladas de temperatura (27-28°C) e umidade relativa (75-90%). O controle da umidade foi conduzido com o uso de solução salina de NaCl, conforme protocolo de criação estabelecido por Dorneles e colaboradores (2021).

Fungicida agrícola e exposição crônica

As concentrações para exposição dos imaturos foram definidas a partir da dose de campo máxima do produto comercial Unizeb Gold, recomendada para tratamento da doença mancha preta na cultura de *Citrus* spp. (AGROFIT, 2016), com objetivo de representar um cenário próximo à exposição aos agrotóxicos em campo. Esta dose é de 320 g do p.c./100L de água. Este produto é composto por 75% do ingrediente ativo Mancozebe e 25% de outros ingredientes, os inertes.

O bioensaio foi baseado no protocolo 239 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para teste de toxicidade larval em *A. mellifera*, usando exposição repetida (OECD, 2016). As larvas foram divididas em seis grupos experimentais da seguinte forma: cinco tratamentos com diferentes doses de Mancozebe (T1: 1,545 ng, T2: 2,175 ng, T3: 41,29 ng, T4: 45,71 ng e T5: 960 ng de i.a. / μ L de dieta) e um controle sem fungicida. Cada grupo teve três réplicas, sendo 40 larvas por réplica, totalizando desta forma 120 larvas por tratamento. Os imaturos eram monitorados diariamente, e a dose de mortalidade foi registrada desde a transferência das larvas até a emergência dos adultos. Anotou-se também o tempo de desenvolvimento (dias) dos imaturos até a emergência das operárias. A morte dos indivíduos foi identificada pelo tegumento escurecido e pela ausência de movimento dos espiráculos cuja estrutura é relacionada à troca gasosa em insetos. Todos os insetos, assim que emergiram, foram pesados em uma balança analítica (Sartorius BP 210D) para determinar a massa corporal. As pupas e adultos foram inspecionados visualmente quanto a deformidades externas, e os indivíduos deformados, que geralmente exibiam asas contorcidas ou não esticadas, abdômen achatado, foram registrados.

Análise de dados

A análise de sobrevivência dos indivíduos submetidos ao bioensaio foi feita por meio de curvas de Kaplan-Meier utilizando o pacote survival, função '*surv*' (Therneau, 2015). A diferença geral entre as curvas de sobrevivência foi testada pelo teste de Log-Rank, usando a função '*survidiff*' do pacote de survival. Quando significativo, comparações entre os pares de tratamentos foram conduzidas usando a função '*pairwise_survdif*' do pacote survminer (Kassambara et al., 2021). Para comparação dos pesos utilizou-se ANOVA de um fator, seguido de teste de Tukey para verificar a significância. Todas as análises foram realizadas utilizando o software R (versão 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Viena, AT, 2019).

Resultados e Discussão

Durante a exposição dos imaturos de *S. bipunctata* ao fungicida Mancozebe foi possível observar que as larvas consumiram o alimento disponível. Todavia, ao observarmos a taxa de sobrevivência dos imaturos (Figura 1), quando comparada ao controle (0,79 - 95% IC: 0,70 – 0,85)), tem-se que todas as doses causaram efeito letal para as abelhas, posto que a taxa de sobrevivência foi inferior a 50% em todos os tratamentos, como: (i) 32% (95% IC: 0,23 – 0,41) para 1,545 ng de ia/ μ L de dieta; (ii) 21% (95% IC 0,13 – 0,29) para 2,175 ng de ia/ μ L de dieta; (iii) 14% (95% IC: 0,09 – 0,22) para 41,29 ng de ia/ μ L de dieta; (iv) 4% (95% IC: 0,01 – 0,08) para 45,71 ng de ia/ μ L de dieta e não houve sobrevivência para 960 ng de ia/ μ L de dieta 0 (não houve sobrevivência). Dado que foram usadas doses com concentrações bastante realistas daquelas encontradas em situações reais de campo, tais dados evidenciam a necessidade de reavaliação quanto à toxicidade deste produto para organismos não-alvo. Em 2019, o ingrediente ativo Mancozebe ocupou o terceiro lugar no ranking de ingredientes mais vendidos no Brasil, com mais de 49 mil toneladas, atrás apenas dos herbicidas Glifosato e 2,4-D (IBAMA, 2020).

O Mancozebe é o fungicida mais comercializado no Brasil (IBAMA, 2020), o que torna a avaliação e reavaliação de sua periculosidade ambiental de extrema importância. Ele é um fungicida do grupo dos etilenobisditiocarbamatos (EDBC) e subclasse dos ditiocarbamato, e tem sido amplamente utilizado desde seu lançamento em 1944, para a proteção de frutas, vegetais e árvores ornamentais (Calviello et al., 2006). De forma geral, os produtos pertencentes à classe dos EDBC, são fungicidas de contato, que atuam como inibidores multisítio no patógeno inativando enzimas e levando a uma interrupção geral do metabolismo e integridade celular (Gisi e Sierotzki, 2008). Eles também são os produtos mais frequentemente detectados em programas de monitoramento mundial (Blasco et al., 2004). Por exemplo, em dezembro de 2020, a EFSA (European Food Safety Authority) publicou uma revisão geral por pares da avaliação de risco do Mancozebe, a qual trouxe conclusões com base no uso representativo do fungicida para trigo, videira, batata e tomate, além de identificar as lacunas de informações sobre avaliações toxicológicas do composto.

No que tange os organismos não-alvo foram identificadas preocupações, pois ele pode causar desregulação endócrina para esses organismos e representar alto risco para pássaros, mamíferos, artrópodes, organismos aquáticos e macroorganismos do solo (EFSA, 2020). Nesta revisão, os autores destacaram que para abelhas melíferas, há estudos

evidenciando a toxicidade do Mancozebe em testes orais (agudo e crônicos), de contato (agudo), bem como efeitos subletais em testes orais crônico (glândulas hipofaríngeas) para abelhas adultas e toxicidade para larvas de abelhas melíferas (EFSA, 2020).

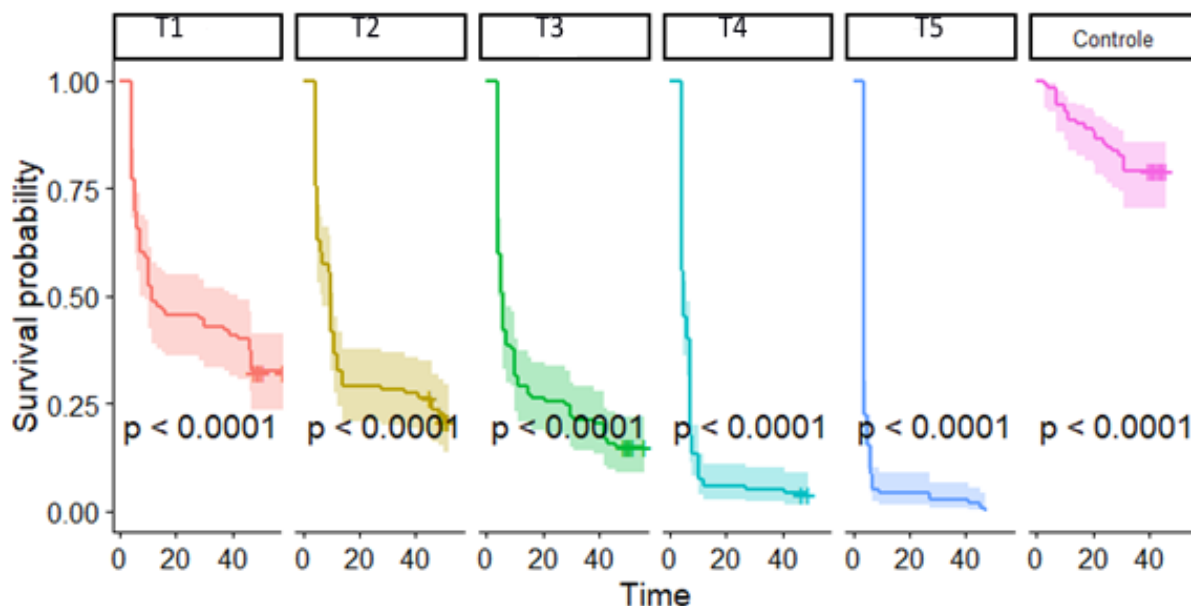


Figura 1: Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Scaptotrigona bipunctata* expostas durante o período de desenvolvimento larval, via dieta alimentar, aos tratamentos (i) T1: 1,545 ng (ii) T2: 2,175 ng, (iii) T3: 41,29 ng, (iv) T4: 45,71 ng e (v) T5: 960 ng ao longo do tempo em dias do desenvolvimento. NOTA: As doses estão em ng do i.a. / μ L de dieta.

As abelhas, por serem insetos holometábolos, realizam mudas durante sua metamorfose para avançar de larva até a fase adulta (Michelette et al., 1993). Portanto, essa fase larval exige muito fisiologicamente dos insetos e qualquer estresse no ambiente pode comprometer a integridade desse processo. Particularidades durante esse período de alimentação, crescimento e metamorfose podem prejudicar mais um grupo de abelhas do que outro. Por exemplo, as abelhas-sem-ferrão, diferentemente das abelhas melíferas, são alimentadas de forma massal com uma massa alimentar semilíquida regurgitada pelas operárias enfermeiras (Menezes et al., 2015). As abelhas melíferas, por sua vez, são alimentadas progressivamente por operárias até a operculação, isso facilita o comportamento higiênico nesta espécie que remove as larvas doentes quando neste processo de alimentação. Em abelhas-sem-ferrão isso não é possível pois além do aprovisionamento massal (único), a célula de cria é fechada.

Assumindo que, em tese, fungicidas não deveriam afetar a biologia das abelhas, visto que o alvo desses produtos são microrganismos patogênicos, é razoável questionar como eles poderiam afetar a saúde das abelhas quando expostas aos fungicidas. Trabalhos recentes parecem prover mecanismos candidatos do porquê tal fenômeno ocorreu nas abelhas em questão. Em 2015, Menezes e colaboradores reportaram o primeiro registro de uma relação mutualística obrigatória entre a abelha-sem-ferrão *Scaptotrigona depilis* e um fungo, identificado inicialmente como *Monascus* sp. (Ascomycotina). Em 2018, Paludo e colaboradores retificaram este trabalho, pois o fungo do gênero *Monascus* sp., está presente apenas no cerume, o fungo ingerido pelas larvas de *S. depilis* foi identificado como a levedura *Zygosaccharomyces* sp. De acordo com os autores, o consumo deste fungo fornece ergosterol para as abelhas em desenvolvimento permitindo o sucesso de pupação.

Em nossas observações diárias, bem como a partir das taxas de sobrevivência de cada tratamento, identificamos uma redução drástica da taxa de sobrevivência dos imaturos (Tabela 1) expostos ao fungicida Mancozebe. O ponto crítico ao longo do desenvolvimento acontece nas mudanças de estágio de larva > pupa > imago, especialmente entre as duas primeiras. Tendo em vista os achados de Menezes et al (2015) e Paludo et al (2018) sobre as relações larva-fungo para uma espécie de abelha filogeneticamente relacionada à espécie investigada aqui, sugere-se que o fungicida Mancozebe pode afetar a sobrevivência de potenciais espécies de fungo que também sejam benéficos para *S. bipunctata*, mas cuja função ainda seja desconhecida. Entretanto, caso sejam as mesmas espécies de fungo, um comportamento similar pode ser esperado como a consequente redução na taxa de sobrevivência dos imaturos nesse estágio do desenvolvimento.

Os processos de mudas larvais são regulados pela ação de hormônios do sistema nervoso central e de glândulas prototorácicas (Davis et al., 2007; Zitnan et al., 2007; Loterio, 2011). Uma vez que as pupas não se alimentam, todo o alimento ingerido pelos insetos durante a fase larval serve como reserva de nutrientes para a metamorfose (Cruz-Landin, 2004; Ferreira, 2010). As proteínas produzidas durante o estágio larval e armazenadas na hemolinfa são denominadas “proteínas de estocagem”, as quais são sintetizadas pelo corpo gorduroso larval em resposta à intensa ingestão de alimento (Scheller et al., 1990; Haunerland, 1996). Além disso, os corpos gordurosos armazenam toxinas, e contribuem no processo de desintoxicação (Feng et al., 2018; Dornelles et al., 2021).

Ainda com base em nossos achados (Tabela 1), sobre a redução na taxa de sobrevivência na metamorfose entre larva e pupa, um fato semelhante foi observado na exposição ao inseticida Clorpirifós em imaturos de *S. bipunctata*, todavia as maiores taxas de mortalidade foram verificadas entre a metamorfose dos estágios de pupa para imago (Dornelles et al. 2021). Esta mortalidade verificada pelos autores pode estar relacionada ao fato de durante a metamorfose, os corpos gordurosos ao mobilizarem a energia necessária para suprir as necessidades metabólicas, liberarem o xenobiótico que estava armazenado nos corpos gordurosos para a hemolinfa das abelha (Tadei et al., 2019; Dornelles et al., 2021). Contudo, mais estudos são necessários para se testar essa hipótese.

Tabela 1: Tabela comparativa da taxa de sobrevivência a cada fase do desenvolvimento das operárias quando expostas a diferentes doses do fungicida Mancozebe.

	Tratamentos (ng de i.a. / μ L de dieta)					
Fase de desenvolvimento	Controle	T1	T2	T3	T4	T5
Larva	94	60	57	38	17	5
Pupa	83	45	28	24	5	1
Imago/adulto emergente	79	37	23	15	4	0

Referente às abelhas que emergiram nos tratamentos (T1, T2 e T3) com a exposição do fungicida, no que tange o peso não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle ($p = 0,07$). Todavia, pudemos observar deformidades nos indivíduos, especialmente asas não desenvolvidas e abdômen achatado (Figura 2). Das abelhas emergidas do tratamento 1 (T1), 14% apresentaram deformidades, em (T2) 37,5% apresentou deformidades e no (T3) 82,3% das abelhas sobreviventes estavam deformadas. Tais deformidades comprometem a funcionalidade dos indivíduos que terão sua aerodinâmica e capacidade de voar prejudicada. Deformidades semelhantes foram observadas em trabalhos que avaliaram o efeito de inseticidas para imaturos de abelhas-sem-ferrão a exemplo de: imaturos de *S. bipunctata* quando submetidos ao inseticida organofosforado Clorpirifós

(Dorneles et al., 2021) e imaturos de *Melipona quadrifasciata* expostos ao inseticida Azadiractina e ao inseticida Spinosad (Barbosa et al., 2015).



Figura 2: Operárias emergidas com deformidades (seta preta: asa não desenvolvida, seta azul: abdômen achatado) após exposição crônica dos imaturos ao fungicida Mancozebe nas doses (A) 1,545 ng; (B) 2,175 ng e (C) 41,29 ng de i.a. / μ L de dieta).

As classes de agrotóxicos com ação herbicida e fungicida comumente são vistas como seguras ou menos tóxicas para insetos (não-alvos) como as abelhas, uma vez que estes não apresentam a rota metabólica de ação desses agrotóxicos (Gisi e Sierotzki, 2008). Entretanto, com base em nossos resultados, não podemos assumir tal pressuposto.

Gomes e colaboradores (2017) verificaram toxicidade do Mancozebe para forrageiras de *A. mellifera* após exposição aguda por contato. A alta toxicidade de Mancozebe, observada em nosso estudo, ocasionando efeitos letais para os imaturos, bem como os dados da literatura para adultos de *A. mellifera*, deve ser investigada quanto ao uso do produto comercial, e não apenas o ingrediente ativo em questão, pois é sabido que para aumentar a eficácia dos agrotóxicos compostos/adjuvantes, os inertes como denominados na bula, são acrescentados à fórmula para formar o produto comercial (Mulin et al., 2015; Yusoff, 2016; Mesnage, 2018). Em 2014, Zhu e colaboradores demonstraram que os ingredientes inertes, presentes nas formulações comerciais também são tóxicos para as abelhas. Entretanto, nas bulas, esses compostos não são especificados, o que dificulta estudos sobre sua toxicidade e justifica o baixo número de estudos sobre avaliação de risco dos inertes para insetos não-alvos (Mulin et al., 2015).

Ao avaliarem a toxicidade de Mancozebe para forrageiras de *Melipona capixaba*, Gomes e colaboradores (2017) não registraram efeito letal para as abelhas. No entanto o produto pode representar risco em potencial, uma vez que as forrageiras acabam por levar

os recursos florais contaminados para a colônia, os quais posteriormente vão servir de alimento para a prole (Brodschneider e Crailsheim, 2010), podendo causar efeitos subletais aos imaturos, ou mesmo letais conforme observamos no presente estudo.

Considerando-se a importância da inclusão de abelhas representativas da fauna nativa brasileira em avaliações de risco a agrotóxicos (Dorigo et al., 2019; Rosa et al., 2020), bem como de estudos desses insetos em distintos estágios de desenvolvimento, este estudo apresenta evidências dos efeitos danosos do fungicida Mancozebe. Consequentemente, estes resultados indicam a necessidade de reavaliação do produto para instrumentalizar apropriadamente os tomadores de decisões para a conservação dos polinizadores.

Conclusão

Diante dos resultados deste estudo, ressalta-se a importância de aumentar a atenção quanto às avaliações de risco, bem como da reavaliação dos protocolos de liberação e registro dos agrotóxicos. Destaca-se a necessidade da inserção de avaliações de risco de fungicidas agrícolas para organismos não-alvo, com o objetivo de tornar as recomendações para uso desses produtos mais seguras para as abelhas nativas. Por fim, conclui-se que o produto comercial Unized Gold, que contém como ingrediente ativo o fungicida Mancozebe, apresenta efeitos letais em imaturos de *S. bipunctata* mesmo em doses atualmente consideradas seguras para aplicação em campo.

Referências

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**, Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2020. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 01 ago 2021.

AIZEN, M. A.; GARIBALDI, L. A.; CUNNINGHAM, S. A.; KLEIN, A. M. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. **Annals of Botany**, v. 103, n. 9, p. 1579–1588, 2009.

BARBOSA, W.F., TOMÉ, H.V.V., BERNARDES, R.C., SIQUEIRA, M.A.L., SMAGGHE, G., GUEDES, R.N.C. Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee

Melipona quadrifasciata. **Environ. Toxicol. Chem.** 34, 2149-2158, 2015. <https://doi.org/10.1002/etc.3053>.

BIDDINGER, D. J.; ROBERTSON, J. L.; MULLIN, C.; FRAZIER, J.; ASHCRAFT, S. A.; RAJOTTE, E. G.; JOSHI, N. K.; VAUGHN, M. Comparative Toxicities and Synergism of Apple Orchard Pesticides to *Apis mellifera* (L.) and *Osmia cornifrons* (Radoszkowski). **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e72587, 2013.

BOSSERT, S.; ELIZABETH, A; MURRAY, E; ALMEIDA, S. G.; BRADY, B.; BLAIMER, B. Combining transcriptomes and ultraconserved elements to illuminate the phylogeny of Apidae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.130, p. 121 -131, 2019.

BRITTAİN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, v. 12, n. 4, p. 321–331, 2011.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 278–294, 2010.

CALVIELLO, G.; PICCIONI, E.; BONINSEGNA, A.; TEDESCO, B.; MAGGIANO, N.; SERINI, S.; WOLF, F. I.; PALOZZA, P. DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: involvement of the oxidative mechanism. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, n. 2, p. 87–96, 2006.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D. & Melo, G. A. R. (Orgs). **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version**. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>. Acesso em: 01 ago 2021.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. Editora UNESP, São Paulo, p.109-181, 2009.

DAVIS, M.; O'KEEFE, S.L.; PRIMROSE, D.A.; HODGETTS, R.B.. A neuropeptide hormone cascade controls the precise onset of post-eclosion cuticular tanning in *Drosophila melanogaster*. **Development**, 134, 4395-4404, 2007.

DORIGO, A. S.; ROSA-FONTANA, A. S.; SOARES-LIMA, H. M.; GALASCHI-TEIXEIRA, J. S.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLOS ONE**, v. 14, n. 3, p. e0213109, 2019.

DORNELES, A. L.; ROSA-FONTANA, A. S.; DOS SANTOS, C. F.; BLOCHTEIN, B. Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. **Environmental Pollution**, v. 272, p. 116414, 2021.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA), Abdourahime H, Anastassiadou M, et al. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mancozeb. **EFSA Journal**. 2020;18(12):e05755. Published 2020 Dec 16. doi:10.2903/j.efsa.2020.5755

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZFONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015.

GISI, U.; SIEROTZKI, H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. **European Journal of Plant Pathology**, v. 122, n. 1, p. 157–167, 2008.

GOMES, I. N. **Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* e *Apis mellifera***. 2017. 51f. Dissertação (Mestrado em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários) - Universidade Federal de Viçosa, Florestal. 2017.

HAUNERLAND, N. H. Insect storage proteins: gene families and receptors. **Insect Biochem. Mol. Biol**, n. 26, p. 755-765, 1996.

FENG, Y.; LUTHRA, A.; DING, K.; YANG, Y.; SAVAGE, J.; WEI, X.; MOESCHTER, R.; AHUJA, S.; VILLEGAS, V.; TORBINA, B.; AHOOJA, A.; ELLIS, T.; BOECHLER, A.; ROBERTS, A. Mid-infrared spectroscopy study of effects of neonicotinoids on forager honey bee (*Apis mellifera*) fat bodies and their connection to colony collapse disorder. **bioRxiv**, p. 205112, 2018.

FERREIRA, R. A. C. **Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico**. 2010. 72 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

FREITAS, B. M.; SILVA, C. I. O papel dos polinizadores na produção agrícola no Brasil. In: **Agricultura e Polinizadores**. 1 ed. São Paulo: A.B.E.L.H.A. – Associação Brasileira de Estudos das abelhas, p. 71, 2015.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatório de Comercialização dos Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 01 ago 2021.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES – IPBES. **Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production**. POTTS, S.G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; NGO, H.T.; BIESMEIJER, J.C.; BREEZE, T.D.; DICKS, L.V.; GARIBALDI, L.A.; HILL, R.; SETTELE, J.;

VANBERGEN, A.J.; AIZEN, M.A.; CUNNINGHAM, S.A.; EARDLEY, C.; FREITAS, B.M.; GALLAI, N.; KEVAN, P.G.; KOVACS-HOSTYANSZKI, A.; KWAPONG, P.K.; LI, J.; LI, X.; MARTINS, D.J.; NATES-PARRA, G.; PETTIS, J.S.; RADER, R.; VIANA, B.F. (eds.). Bonn, Germany: 2016.

JACOB, C. R. O.; MALAQUIAS, J. B.; ZANARDI, O. Z.; SILVA, C. A. S.; JACOB, J. F. O.; YAMAMOTO, Pedro T. Oral acute toxicity and impact of neonicotinoids on *Apis mellifera* L. and *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 28, n. 7, p. 744–753, 2019.

JOHNSON, R. M.; DAHLGREN, L.; SIEGFRIED, B. D.; ELLIS, M. D. Acaricide, Fungicide and Drug Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). **PLOS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54092, 2013.

KANG, M.; JUNG, C. Avoidance Behavior of Honey bee, *Apis mellifera* from Commonly used Fungicides, Acaricides and Insecticides in Apple Orchards. **Journal of Apiculture**, v. 32, n. 4, p. 295–302, 2017.

KLATT, B. K.; HOLZSCHUH, A.; WESTPHAL, C.; CLOUGH, Y.; SMIT, I.; PAWELZIK, E.; TSCHARNTKE, T. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, n. 1775, p. 20132440, 2014.

LAUTENBACH, S.; SEPPELT, R.; LIEBSCHER, J.; DORMANN, C. F. Spatial and Temporal Trends of Global Pollination Benefit. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35954, 2012.

LOTARIO, G.A. **Os genes codificadores de glutatona S-transferases na abelha *Apis mellifera*: expressão, regulação e função durante e após a metamorfose.** 2011. 93 p. Dissertação de Mestrado (Genética) apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MALERBO-SOUZA, D. T.; NOGUEIRA-COUTO, R. H.; COUTO, L. A. Honey bee attractants and pollination in sweet orange, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, var. Pera-Rio. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 10, p. 144–153, 2004.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; MARSAIOLI, A. J.; ZAMPIERI, D.; FONTOURA, I. C.; LUCHESSI, A. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A Brazilian Social Bee Must Cultivate Fungus to Survive. **Current Biology**, v. 25, n. 21, p. 2851–2855, 2015.

MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. **Frontiers in Public Health**, v. 5, p. 361, 2018.

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

MULLIN, C. A.; FINE, J. D.; REYNOLDS, R. D.; FRAZIER, M. T. Toxicological Risks of Agrochemical Spray Adjuvants: Organosilicone Surfactants May Not Be Safe. **Frontiers in Public Health**, v. 4, p. 92, 2016.

MULLIN, C. A., FRAZIER, M., FRAZIER, J. L., ASHCRAFT, S., SIMONDS, R., VANENGELSDORP, D.; PETTIS, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLOS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010.

MUSSEN, E. C.; LOPEZ, J. E.; PENG, C. Y. S. Effects of Selected Fungicides on Growth and Development of Larval Honey Bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Entomology**, v. 33, n. 5, p. 1151–1154, 2004.

OECD. Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Repeated Exposure, nº 239. **OECD Environment, Health and Safety Publications**, 2016.

PALUDO, C. R.; MENEZES, C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; VOLLET-NETO, A.; ANDRADE-DOMINGUEZ, A.; PISHCHANY, G.; KHADEMPOUR, L.; NASCIMENTO, F. S.; CURRIE, C. R.; KOLTER, R.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1122, 2018.

R Core Team (2019) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RICKETTS, T. H.; REGETZ, J.; STEFFAN-DEWENTER I., CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN C.; BOGDANSKI, A.; GEMMILL-HERREN, B.; GREENLEAF, S. S.; KLEIN, A. M.; MAYFIELD, M. M.; MORANDIN, L. A.; OCHIENG', A.; VIANA, B. F. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology Letters**, v. 11, n. 5, p. 499–515, 2008.

ROSA-FONTANA, A. S.; DORIGO, A. S.; GALASCHI-TEIXEIRA, J. S.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase? **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114849, 2020.

ROSA, A. S.; TEIXEIRA, J. S. G.; VOLLET-NETO, A.; QUEIROZ, E. P.; BLOCHTEIN, B.; PIRES, C. S. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729–738, 2016.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide Residues and Bees – A Risk Assessment. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014.

SCHELLER K.; FISHER B.; SCHENKEL H. 1990. Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. In: HAGERDORN, H. H.; HILDEBRAND, J. G.; KIDWELL, M. G.; LAW, J. H.; (Eds.), *Mol. Insect Sci.* Plenum, 1990.

SEM ABELHA SEM ALIMENTO. **Polinização.** Disponível em: <<http://www.semabelhasemalimento.com.br/home/polinizacao/>>. Acesso em: 01 ago. 2021.

SLAA, E. J.; CHAVES, L. A. S.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; HOFSTEDE, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 293–315, 2006.

TADEI, R., DOMINGUES, C. E., MALAQUIAS, J. B., CAMILO, E. V., MALASPINA, O., & SILVA-ZACARIN, E. C. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

THERNEAU, T. M. (2015). **A Package for Survival Analysis in R**. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=survival>>.

TOREZANI, K. R. S. **Polinização da aboboreira (*Cucurbita pepo* L.): um estudo sobre a comunidade de abelhas em sistemas orgânicos e convencionais de produção no Distrito Federal**. 2015. 65 f., il. Dissertação (Mestrado em Zoologia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

YODER, J. A. et al. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 76, n. 10, p. 587–600, 2013.

YUSOFF, S. N. M.; KAMARI, A.; ALJAFREE, N. F. A. A review of materials used as carrier agents in pesticide formulations. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 13, n. 12, p. 2977–2994, 2016.

ZITNAN, D.; ADAMS, M.E. Neuroendocrine Regulation of Insect Ecdysis. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. (Eds.), **Comprehensive Molecular Insect Science**, v.4, 2005.

2. MANUSCRITO 2

#Este manuscrito será submetido para a revista Chemosphere

Dose intermediária de Piraclostrobina é letal para larvas da abelha-sem-ferrão *Scaptotrigona bipunctata*

Jenifer Dias Ramos, Andressa Dornelles, Betina Blochtein

Resumo

A agricultura mundial tem evoluído muito nos últimos anos com o uso de múltiplas tecnologias como drones e inteligência artificial. Porém, ela é ainda muito dependente de produtos controversos como os agrotóxicos. Estes produtos protegem as plantas de pragas e doenças, mas podem causar efeitos secundários na biodiversidade silvestre de polinizadores, como as abelhas, das quais muitas culturas agrícolas dependem em algum nível. Até mesmo a ação de produtos considerados não prejudiciais às abelhas, como fungicidas e herbicidas, estão sendo questionados ultimamente pois a exposição desde abelhas adultos à alimentação provida aos imaturos parece prejudicar esses insetos. Neste contexto, este trabalho objetivou avaliar o efeito do fungicida Piraclostrobina em operárias jovens de *Scaptotrigona bipunctata* expostas, via dieta contaminada, a três doses de Piraclostrobina ($1,30 \times 10^{-4}$, $3,25 \times 10^{-3}$, $6,5 \times 10^{-3}$ de μl i.a./larva, as quais foram calculadas com base na dose de campodose de campo aplicada em pomares de citros. Nossos dados demonstraram uma elevada redução da taxa de sobrevivência de imaturos expostos à dose intermediária (0,185 - 95% IC: 0,125 - 0,275) do fungicida diferindo significativamente do controle (0,87 - 95% IC: 0,807 - 0,938), enquanto as outras doses não diferiram $1,30 \times 10^{-4}$ μl de ia/larva (0,677- 95% IC: 0,582 - 0,786) e $6,5 \times 10^{-3}$ μl de ia/larva (0,811 - 95% IC: 0,741 - 0,887). Consequentemente, os efeitos causados pela dose intermediária foram, no mínimo, 3,6 vezes mais letais às abelhas jovens quando comparadas às outras doses testadas. Nosso trabalho traz evidências de uma resposta inesperada no efeito da dose de Piraclostrobina em relação à resposta das abelhas imaturas. Portanto, é questionável a sua indicação como

produto não-prejudicial às abelhas. Além disso, recomenda-se deixar claro que o efeito positivo no combate a doenças fúngicas pode adversamente comprometer a polinização das culturas dependentes desse serviço ecossistêmico.

Palavras-chave: análise de risco, fungicidas, Comet, polinizadores, Meliponini, contaminação ambiental, conservação.

Abstract

World agriculture has evolved a lot in recent years with the use of multiple technologies such as drones and artificial intelligence. However, it is still very dependent of products such as pesticides. These products protect plants from pests and diseases, but can cause side effects on wild biodiversity from pollinators such as bees, on which many agricultural crops depend to some degree. Even the action of products considered not harmful to bees, such as fungicides and herbicides, have been questioned lately because the exposure of adult bees to the food provided to the immature ones seems to harm these insects. In this context, this work aimed to evaluate the effect of the fungicide Pyraclostrobin in young workers of *Scaptotrigona bipunctata* exposed, via contaminated diet, to three doses of Pyraclostrobin (1.30×10^{-4} , 3.25×10^{-3} , 6.5×10^{-3} de $\mu\text{l a.i./larva}$), which were calculated based on the field rate applied in citrus groves. Our data demonstrated a high reduction in the survival rate of immatures exposed to the intermediate dose (0.185 - 95% CI: 0.125 - 0.275) of the fungicide differing significantly from the control (0.87 - 95% CI: 0.807 - 0.938), while the other doses did not differ $1.30 \times 10^{-4} \mu\text{l ai/larva}$ (0.677- 95% CI : 0.582 - 0.786) and $6.5 \times 10^{-3} \mu\text{l ai/larva}$ (0.811 - 95% CI: 0.741 - 0.887) Consequently, the effects caused by the intermediate dose were at least 3.6 times more lethal to young bees when compared to the other doses tested. Our work provides evidence of an unexpected response in the effect of the dose of Piraclostrob in relation to the response of immature bees. Therefore, its indication as a non-harmful product to bees is questionable. In addition, it is recommended to clarify that the positive effect in combating fungal diseases can adversely affect the pollination of crops dependent on this ecosystem service.

Key-words: risk assesement, fungicides, Comet, pollinators, Meliponini, environmental contamination, conservation.

Introdução

A polinização é considerada um serviço ecossistêmico regulatório, de provisão e cultural, sendo uma interação ecológica que fornece muitos benefícios aos seres humanos (IPBES, 2019) dentre os quais destaca-se a sua contribuição para a produção de alimentos. De forma geral, os frutos provenientes de flores polinizadas têm mais sementes, melhor formato, maior valor nutritivo, melhor sabor e durabilidade (Malagodi-Braga & Peixoto Kleinert 2004; Garratt et al. 2014; Junqueira & Augusto 2017; Nunes-Silva et al., 2020). Diante destes benefícios, o valor econômico da polinização global foi estimado entre US \$235 bilhões e US \$577 bilhões (IPBES, 2019). No Brasil, este valor é aproximadamente de US \$12 bilhões por ano (Giannini et al. 2015b).

No espectro de polinizadores, as abelhas têm papel destacado, enquanto polinizadores profissionais de 73% das culturas agrícolas voltadas à alimentação humana (Klein et al., 2007). Entretanto, o declínio de suas populações tem sido amplamente registrado (Giglio et al., 2017; Castilhos et al., 2019; Sanchez-Bayo e Wyckjuys, 2019; Goretti et al., 2020; Smith et al., 2020; Traynor et al., 2021).

Este declínio tem causa multifatorial, entre as quais destacam-se as mudanças no uso da terra, a agricultura intensiva e de larga escala, o uso de organismos geneticamente modificados, as pragas e patógenos, e o uso de agrotóxicos (IPBES, 2019). Este último, por sua vez, quando aplicado sem planejamento nas lavouras e não avaliado seu risco para organismos não-alvo, pode provocar a morte, atuar como repelente e causar efeitos tóxicos subletais (desorientação do voo, redução na produção de prole, entre outros) nas abelhas (Freitas e Pinheiro, 2010; Poquet et al., 2016; Tosi et al., 2017; Tadei et al., 2019; Dornelles et al., 2021). Além disso, o uso de agrotóxicos tende a suprimir ou reduzir a produção de néctar e pólen em algumas plantas (Johansen & Mayer 1990), os quais são como alimentos ingeridos pelas abelhas adultas e larvas (Zhu et al., 2014; Beyer et al., 2018).

O Brasil possui a maior riqueza global de abelhas-sem-ferrão (Michener, 2013) e também é o maior consumidor mundial de agrotóxicos (Bombardi 2017 ; dos Santos et al. 2018). A literatura sobre toxicidade de inseticidas para as abelhas têm se ampliado, dado que estes insetos benéficos podem ser contaminados por estes produtos (Rosa et al., 2016; dos Santos et al., 2016; Dively et al., 2017; Araújo, 2018; Tadei et al., 2019; Wang et al., 2020). Nestes estudos ecotoxicológicos, *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) é a espécie adotada como

modelo experimental, devido a sua ampla distribuição geográfica, importância econômica como polinizadora global, produtora de mel e subprodutos, conhecimento de sua biologia e a possibilidade de manejo em laboratório. No Brasil, a avaliação de risco de agrotóxicos também toma como modelo esta espécie. No entanto, o uso de *A. mellifera* como organismo-modelo substituto para espécies nativas brasileiras de abelhas-sem-ferrão tem sido questionado (Rosa-Fontana et al., 2020).

Além dos inseticidas, outra classe de agrotóxico amplamente utilizado na agricultura são os fungicidas. A exposição a estes produtos está correlacionada com uma variedade de distúrbios nas colônias de abelhas, incluindo ausência de cria, substituição da rainha, enfraquecimento da colônia, redução do consumo e digestão de pólen, e aumento dos tipos de vírus detectados (De Grandi Hoffman et al., 2013, 2015; Simon-Delso et al., 2014; Zhu et al., 2014; Johnson et al., 2017; Christen et al., 2019). Os depósitos de pólen e os favos de cera das abelhas melíferas são frequentemente contaminados com fungicidas (Mullin et al., 2010; Pettis et al., 2012).

No Brasil, atualmente estão registrados 546 fungicidas comerciais, divididos em mais de 50 grupos químicos (MAPA, 2020). A Piraclostrobina é um fungicida pertencente ao grupo das estrobilurinas, o segundo maior grupo em vendas no mercado mundial (Morton & Staub, 2008). O mecanismo de ação dos fungicidas estrobilurinas ocorre por meio da inibição da respiração de fungos e demais eucariotos (Bartlett et al., 2002; Parreira et al., 2009). No Brasil, o ingrediente ativo Piraclostrobina pode ser encontrado em 24 produtos formulados, na sua forma livre ou associado a outros ingredientes ativos (MAPA, 2020).

Pettis et al. (2013) detectaram concentrações extremamente elevadas de Piraclostrobina em amostras de pólen. Estudos indicam que a alimentação contendo resíduos deste fungicida pode prejudicar a performance individual de larvas de abelhas e adultos (Zaluski et al., 2017; Tadei et al., 2019; Batista et al., 2020), e consequentemente afetar a colônia (Pettis et al., 2013; Traynor et al., 2021). Desta forma, este trabalho objetivou avaliar o efeito do fungicida Piraclostrobina, via dieta contaminada, em operárias imaturas de *Scaptotrigona bipunctata*, relacionando à sobrevivência dos imaturos ao longo de seu desenvolvimento larval e avaliando a morfologia dos indivíduos sobreviventes.

Materiais e Métodos

Coleta de material e Criação *in vitro*

Nossos experimentos foram conduzidos entre os meses de março e maio de 2018. Utilizou-se favos de cria de três colônias de *Scaptotrigona bipunctata* mantidas no Meliponário autorizado pelo IBAMA, localizado na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (30° 1' 40" S, 51° 13' 43" O).

Em condições de laboratório, foram utilizadas placas de criação de abelhas com cavidades de dimensões semelhantes às células de cria de operárias de favos naturais de *S. bipunctata*. Posteriormente, foram depositados com o auxílio de micropipetas automáticas 35 microlitros de alimento larval coletado em favos recém aprovisionados pelas operárias em colônias matrizes (Dornelles et al., 2021). Sobre o alimento foram transferidas larvas de aproximadamente 24h de vida, também de colônias matrizes. As placas de criação foram acondicionadas em recipientes herméticos com tampa e mantidas em uma câmara de incubação (BOD) sob condições controladas de temperatura (27-28°C) e umidade relativa (70-90%) de acordo com Dornelles e colaboradores (2021).

Fungicida agrícola e exposição crônica

Com o objetivo de representar um cenário mais próximo da realidade do campo, as concentrações para exposição das abelhas imaturas foram definidas a partir da dose de campo máxima do produto comercial Comet, recomendada para tratamento da doença *Phyllosticta citricarpa* (Mancha preta) na cultura de *Citrus* spp. (AGROFIT, 2016). Esta taxa é de 15 mL do p.c./100 L de água. Este produto é composto por 25% do ingrediente ativo Piraclostrobina e 80% de outros ingredientes, os inertes. A partir desta dose de campo foram realizadas diluições equivalentes a 50%, 25% e 1% da dose do produto comercial aplicada no campo.

O bioensaio foi baseado no protocolo 239 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para teste de toxicidade larval em *A. mellifera*, usando exposição repetida (OECD, 2016). As larvas foram divididas em quatro grupos experimentais

da seguinte forma: três tratamentos com diferentes doses de Piraclostrobina ($1,30 \times 10^{-4}$, $3,25 \times 10^{-3}$, $6,5 \times 10^{-3}$ de $\mu\text{L i.a./larva}$), equivalentes aos percentuais já mencionados, e um controle sem fungicida. Cada grupo teve três réplicas, sendo 40 larvas por réplica, totalizando desta forma 120 larvas por tratamento. Observações diárias, com o registro do número de mortes, foram realizadas ao longo do desenvolvimento dos imaturos, até a emergência das operárias. Como não foi possível distinguir larvas de machos, no início da criação, estes foram excluídos do estudo. Para a confirmação das mortes dos imaturos foi considerada a ausência de movimento dos espiráculos e/ou tegumento com coloração cinza escura (Material Suplementar 1). As pupas e adultos foram inspecionados visualmente quanto a deformidades externas, e os indivíduos deformados, que geralmente exibiam asas não desenvolvidas ou contorcidas e abdômen achatado, foram registrados para análise subsequente. Após a emergência, todas as abelhas foram pesadas em uma balança analítica (Sartorius BP 210D) para determinar a massa corporal. E 30 abelhas por tratamento foram utilizadas para a análise morfológica.

Análise de dados

A análise de sobrevivência dos indivíduos submetidos ao bioensaio foi feita por meio de curvas de Kaplan-Meier utilizando o pacote survival, função '*surv*' (Therneau, 2015). A diferença geral entre as curvas de sobrevivência foi testada pelo teste de Log-Rank, usando a função '*survidiff*' do pacote de survival. Quando significativo, comparações entre os pares de tratamentos foram conduzidas usando a função '*pairwise_survdif*' do pacote survminer (Kassambara et al., 2021). Para comparação dos pesos utilizou-se ANOVA de um fator, seguido de teste de Tukey para verificar a significância.

Para analisar a morfologia das abelhas emergidas foram selecionadas as medidas: largura e altura da cabeça, distância intertegular e distância interorbital. Antes de conduzir as análises morfológicas, realizou-se uma análise de colinearidade para verificarmos se elas não eram autocorrelacionadas entre si. Para isso, foi usada a função '*vif*' do pacote car (Fox e Weisberg, 2019, a qual demonstrou que as variáveis não eram colineares entre si. Com estas medidas, utilizamos uma ANOVA com permutações (PERMANOVA) seguida de uma análise pareada usando as funções '*adonis*' do pacote vegan (Oksanen et al., 2020) e

'pairwise.adonis' do pacote pairwiseAdonis (Arbizu, 2020). Todos os resultados foram analisados com o programa R (versão 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Viena, AT, 2019).'

Resultados e Discussão

Durante a exposição dos imaturos de *S. bipunctata* à Piraclostrobina foi possível observar que nenhum tratamento apresentou efeito repelente para as larvas, posto que o alimento larval foi integralmente consumido em todos os grupos experimentais. Todavia ao observarmos a taxa de sobrevivência dos imaturos (Figura 1) tratados com o fungicida, quando comparada ao controle (0,87 - 95% IC: 0,807 – 0,938), temos a dose intermediária ($3,25 \times 10^{-3}$ de μl i.a./larva) diferindo significativamente ($p < 0,05$) e causando efeito letal para os imaturos, dado que apenas 18% das abelhas sobreviveram (0,185 - 95% IC: 0,125 – 0,275). As doses de $1,30 \times 10^{-4}$ μl de i.a./larva (0,677- 95% IC: 0,582 – 0,786) e $6,5 \times 10^{-3}$ μl de i.a./larva (0,811 - 95% IC: 0,741 – 0,887), não diferiram do controle (0,87 - 95% IC: 0,807 – 0,938) (Figura 1).

Esse dado é importante porque organismos filogeneticamente bastante distantes entre si como são os artrópodes (aqui, as abelhas) e vertebrados como peixes podem apresentar efeitos parecidos quando expostos a agrotóxicos. Por exemplo, resultados semelhantes a esses têm sido registrados em outros modelos experimentais como peixes, quando a dose intermediária dos agrotóxicos se apresenta mais tóxica que doses mais altas e/ou baixas (Persch et al. 2018).

Em 2019, Tadei e colaboradores não registraram mortalidade de larvas de *A. mellifera* quando expostas a uma dose baixa de Piraclostrobina (23.63 ng/larva), entretanto ao avaliarem o comportamento dos adultos emergidos, destes experimentos, verificaram o efeito tardio do fungicida na atividade locomotora das abelhas.

Thompson e coautores (2014) sugerem que a toxicidade do fungicida é altamente dependente da dose ingerida pelas abelhas. Em nossos resultados com Piraclostrobina não observamos essa relação proporcional, uma vez que a dose intermediária se mostrou mais tóxica para as abelhas. No entanto, cabe destacar que mesmo em doses baixas, distúrbios no desenvolvimento larval foram observados em outras classes de fungicidas (Mussen et al.,

2004). Além disso, em nossos resultados observamos que as abelhas expostas à dose mais baixa e à dose mais alta de Piraclostrobina tiveram o tempo de desenvolvimento aumentado (50 dias) em 25% quando comparado ao tempo de desenvolvimento dos imaturos controle (40 dias) (Figura 1).

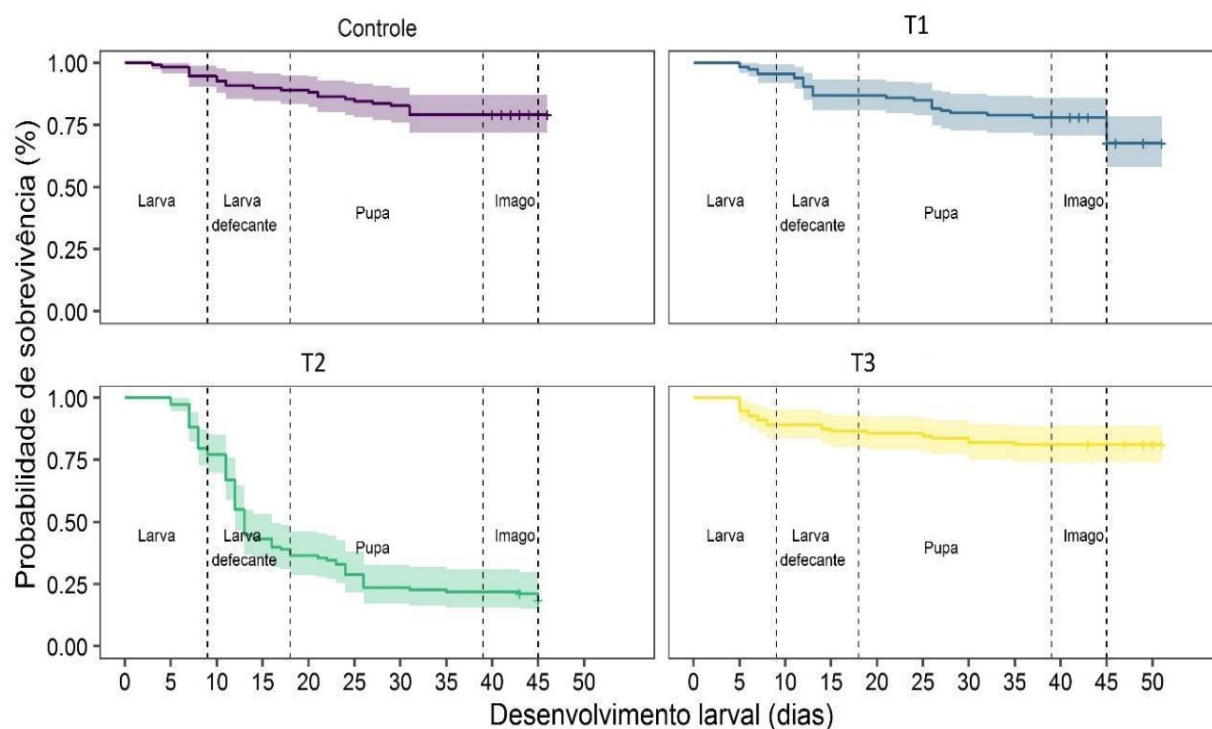


Figura 1: Probabilidade de sobrevivência de operárias de *Scaptotrigona bipunctata* criadas *in vitro*, e expostas durante o período larval, via dieta alimentar, as doses/tratamentos de (T1: $1,30 \times 10^{-4}$, T2: $3,25 \times 10^{-3}$, T3: $6,5 \times 10^{-3}$ de μl i.a./larva).

As abelhas são insetos holometábolos, passando, portanto, por uma metamorfose completa, com quatro estágios distintos durante o desenvolvimento: embrionário, larval, pupal e adulto (Michelette et al., 1993). Durante a fase larval, o processo de alimentação difere entre abelhas melíferas e abelhas-sem-ferrão (ASF). As primeiras são alimentadas progressivamente por operárias até a operculação da célula de cria, e as ASF por sua vez recebem uma alimentação massal, na qual as operárias enfermeiras aprovisionam a célula de cria com uma massa alimentar, após a rainha ovipositar, a célula é operculada imediatamente. Em 2015, Menezes e colaboradores reportaram o primeiro registro de uma relação simbiótica entre a abelha sem ferrão *S. depilis* e um fungo identificado inicialmente

como do gênero *Monascus*. Em 2018, Paludo e coautores após avaliação genômica determinaram o fungo da relação como a levedura do gênero *Zygosaccharomyces* sp. Este fungo fornece precursores de esteróides essenciais para o desenvolvimento da abelha, especialmente para a fase de pupação que requer hormônios ecdisteróides, os quais são obtidos por meio da dieta pelos insetos (Paludo et al., 2018). Em nossos resultados, bem como nas observações diárias verificamos um intervalo crítico de tempo de desenvolvimento (na mudança de larva se alimentando para larva defecante), em que ocorre a maior taxa de mortalidade das abelhas expostas a dose intermediária do fungicida. E uma baixa na sobrevivência entre a mudança de larva > pupa, para a dose baixa e alta. Com base nas relações descritas por Menezes (2015) e Paludo (2018) sugere-se a possibilidade de algumas doses de Piraclostrobina atuarem desregulando a dinâmica de crescimento das populações de fungos associados ao alimento larval (Paludo et al., 2018).

Outra explicação possível para este achado é a baixa solubilidade do fungicida em água (NCBI, 2017), o que favorece o acúmulo do xenobiótico nos corpos gordurosos da larva (Feng et al., 2017), dado que armazenam toxinas, e contribuem no processo de desintoxicação (Feng et al., 2018; Dornelles et al., 2021). Esse armazenamento pode resultar em estresse contínuo para os indivíduos durante o desenvolvimento, diferentemente de abelhas adultas que realizam a excreção de resíduos tóxicos pela defecação regular (Zhu et al., 2014). Desta forma, os agrotóxicos absorvidos na fase larval permanecem no organismo da abelha, sendo mobilizados para os sítios-alvos durante a metamorfose (Tadei et al., 2019).

Além da baixa da taxa de sobrevivência à dose intermediária, observamos nas operárias emergidas deformidades no corpo como: o abdômen achatado (não desenvolvido) e as asas não desenvolvidas (Figura 2). Deformações semelhantes foram registradas para imaturos de *Scaptotrigona bipunctata* expostos a doses subletais do inseticida Clorpirifós (Dorneles et al., 2021), imaturos de *Melipona quadrifasciata* expostos ao inseticida Azadiractina e ao inseticida Spinosad (Barbosa et al., 2015) e para rainhas de *Partamona helleri* expostas ao inseticida Azadiractina (Bernardes et al., 2018).

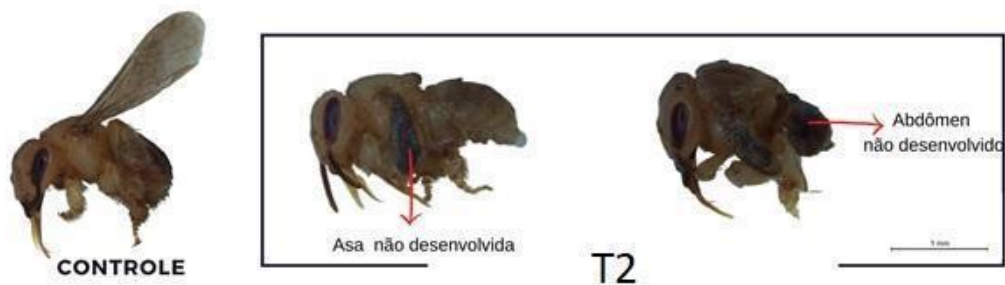


Figura 2: Deformações identificadas em operárias recém-emergidas de *Scaptotrigona bipunctata* após exposição a dose intermediária as doses/tratamentos de $3,25 \times 10^{-3} \mu\text{l}$ de i.a. Piraclostrobina/larva.

A partir das análises morfológicas (Figura 3), das operárias expostas aos tratamentos (T1 e T3), verificou-se diferença significativa ($p < 0.05$) entre abelhas do controle e o tratamento 3, equivalente a dose $6,5 \times 10^{-3}$ de μl i.a./larva. Tal significância também apareceu ao compararmos os pesos das abelhas expostas com as abelhas controle (Figura 4), observa-se que as abelhas estavam mais pesadas na dose mais alta, e mais leves na dose intermediária a qual também diferiu do controle ($p < 0.05$; $F = 39,85$).

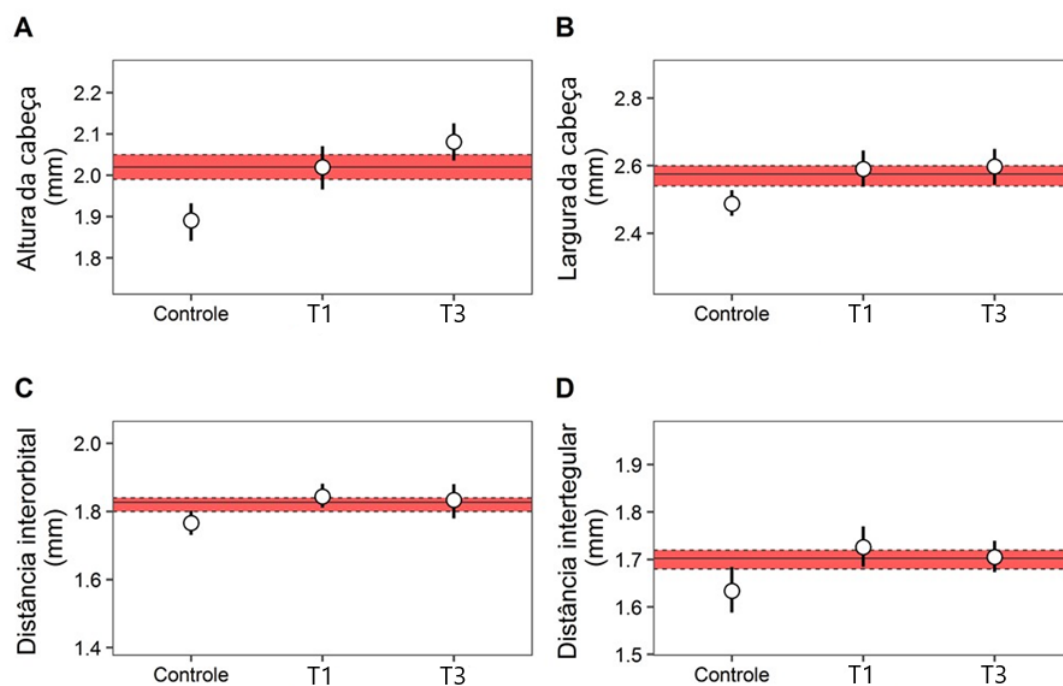


Figura 3. Análise morfológica de imaturos de operárias de *Scaptotrigona bipunctata* expostos às doses/tratamentos T1: $1,30 \times 10^{-4}$, T3: $6,5 \times 10^{-3}$ de μl i.a. Piraclostrobina/larva. Variação da altura da cabeça (mm) em cada tratamento; B) Variação da largura da cabeça (mm) em cada tratamento; C) Variação da distância interorbital (mm) em cada tratamento; D) Variação da distância intertegular (mm) em cada tratamento.

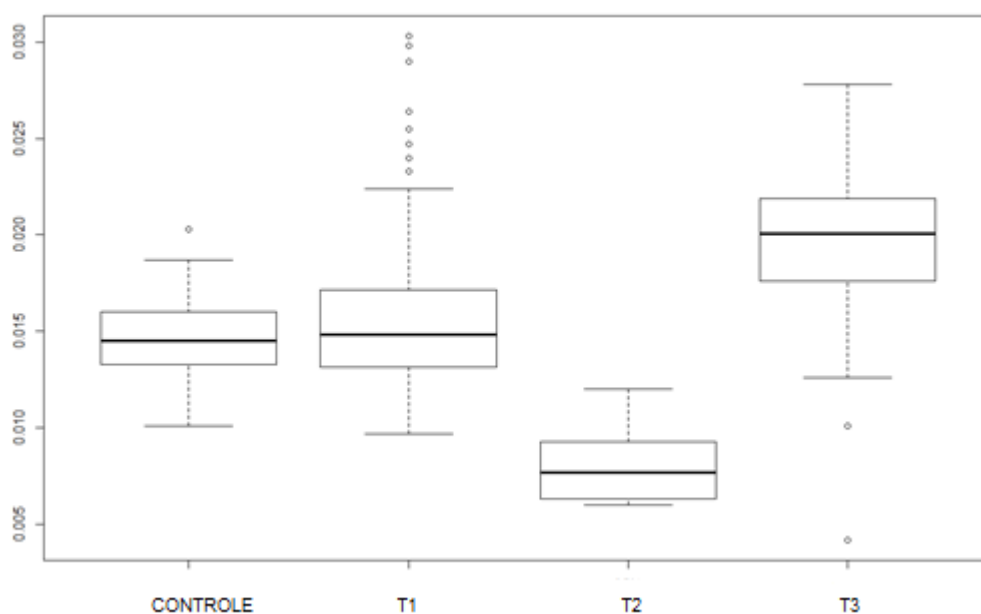


Figura 4: Peso das abelhas recém-emergidas de *Scaptotrigona bipunctata* após exposição as doses/tratamentos de T1: $1,30 \times 10^{-4}$, T2: $3,25 \times 10^{-3}$, T3: $6,5 \times 10^{-3}$ de μl i.a. Piraclostrobina/larva

Apesar das abelhas não serem organismo alvos de fungicidas, estudos recentes que avaliaram o fungicida Piraclostrobina em operárias adultas de *A. mellifera* observaram efeitos deletérios no comportamento e em células de glândulas hipofaríngeas (Zaluski et al., 2017), além de danos no intestino médio (Tadei et al., 2019) que podem dificultar a absorção de nutrientes (Carneito et al., 2015).

Avaliações recentes dos efeitos de concentrações subletais de Piraclostrobina em operárias forrageiras de *Melipona scutellaris* registraram aumento do índice de lesão do intestino médio e sinais morfológicos de morte celular, além de redução na taxa de sobrevivência (Domingues et al., 2020). A formulação comercial da Piraclostrobina (Comet®) também já foi relacionada com a redução da altura de células epiteliais em glândulas mandibulares (Zaluski, Justulin e Orsi, 2017). Alterações na espessura de células epiteliais também foram observadas, porém nas células do intestino médio das abelhas e apenas quando estas foram expostas à formulação comercial (Zaluski, Justulin e Orsi, 2017). Dessa

forma, ingredientes inertes presentes nessa formulação também podem apresentar citotoxicidade em organismos não- alvos (Mullin, 2015; Mullin et al., 2015).

Pettis e colaboradores, em 2013, ao realizarem estudo em campo para determinar como a combinação de agrotóxicos afetam a saúde das abelhas melíferas, identificaram em amostras de pólen mais de 35 agrotóxicos, dentre os quais observaram altas concentrações de fungicidas. Ao analisarem o consumo de pólen das abelhas melífera, quando contaminadas com fungicidas perceberam que eles favorecem a infecção por *Nosema*, especialmente os fungicidas clorotalonil e piraclostrobina, o que sugere que alguns fungicidas têm impactos mais fortes na saúde das abelhas do que se pensava anteriormente (Pettis et al., 2013). A infecção por *Nosema* foi duas vezes mais provável em abelhas que consumiram esses fungicidas do que em abelhas que não o fizeram.

Recentemente, resultados semelhantes foram encontrados por Traynor e colaboradores (2021), em um estudo nos Estados Unidos (EUA), onde foram analisadas amostras de 1.055 apiários, de 39 estados, ao longo de sete anos. No total, 2.933 detecções de agrotóxicos foram encontradas, representando 120 diferentes agrotóxicos. Os fungicidas, foram detectados 641 vezes (29,5% das amostras), e aumentaram a detecção ao longo dos anos. Embora os resíduos destes produtos sejam considerados de baixo risco, eles foram associados ao aumento de mortalidade das colônias (Traynor et al., 2021).

Por fim, embora o fungicida Piraclostrobina atue na inibição da respiração mitocondrial de fungos (Balba, 2007), nossos resultados suportam que ele pode causar efeitos letais para *S. bipunctata*, quando em doses intermediárias, fato que ainda não havia sido reportado para este fungicida, além de efeitos subletais em doses baixas e elevadas. Desta forma, sugerimos que novos estudos sejam desenvolvidos para avaliar os efeitos deste fungicida com o uso de biomarcadores celulares, inclusive com outras espécies de abelhas-sem-ferrão, ampliando a compreensão sobre riscos do ingrediente ativo aos polinizadores silvestres e manejados.

Conclusão

A agricultura moderna ainda é fortemente dependente de agrotóxicos, portanto espera-se que seu uso continue a ser empregado por muito tempo ainda. Como tal, a

letalidade das moléculas desses produtos químicos poderia ser desenvolvida com uma especificidade ainda maior para atingir os organismos-alvo e não aqueles que podem inclusive beneficiar a produtividade final. Assim, com base nos resultados obtidos neste estudo, destaca-se que a exposição à Piraclostrobina pode comprometer o *fitness* das colônias de abelhas-sem-ferrão, tendo em vista os efeitos na sobrevivência da prole, e as potenciais deformações dos indivíduos capazes de comprometer seu papel ecológico.

Nesse sentido, estudos sobre avaliação de risco devem ser ampliados para as abelhas, especialmente para as espécies nativas (capazes de melhor representar a biodiversidade brasileira). Também consideramos prudente a incorporação de testes de avaliação de risco para imaturos de operárias de abelhas-sem-ferrão nos protocolos de análise e registro de fungicidas agrícolas no que tange organismos não-alvos. Esse grupo de abelhas ocorre em toda a região tropical do planeta (América Latina, África Sul da Ásia e Austrália). Portanto, os achados aqui podem servir de alerta e recomendação para produtores rurais, criadores de abelhas e tomadores de decisão de todas essas regiões.

Referências

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**, Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2020. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BALBA, H. Review of strobilurin fungicide chemicals. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, n. 4, p. 441-451, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03601230701316465>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BARTLETT, D. W., CLOUGH, J. M., GODWIN, J. R., HALL, A. A., HAMER, M.; PARR-DOBZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/ps.520>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BATISTA, A. C., DOMINGUES, C. E. D. C., COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees?. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 834-843, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BEYER, M.; LENOUVEL, A.; GUIGNARD, C.; EICKERMANN, M.; CLERMONT, A.; KRAUS, F.; HOFFMANN, L. Pesticide residue profiles in bee bread and pollen samples and the survival of

honeybee colonies—a case study from Luxembourg. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 32163–32177, 2018.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do Uso de Agrotóxicos no Brasil e Conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH-USP, 2017. 269 p.

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. DA S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Disponível em: <https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, C. F.; BUENO FILHO, J. S. S.; BAPTISTA, A. P. M. Toxicidade de acaricidas/ inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae). **Arquivos Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 597-606, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p5972009>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CASTILHOS, D., BERGAMO, G.C., GRAMACHO, K.P., GONÇALVES, L.S. Colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, v. 50, p. 263-272, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CHIRSTEN, V.; KREBS, J.; FENT, K. Fungicides chlorothanolin, azoxystrobin and folpet induce transcriptional alterations in genes encoding enzymes involved in oxidative phosphorylation and metabolism in honey bees (*Apis mellifera*) at sublethal concentrations. **Journal of Hazardous Materials**, v. 377, p. 215–226, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.05.056>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DA COSTA DOMINGUES, C. E., INOUE, L. V. B., DA SILVA-ZACARIN, E. C. M., & MALASPINA, O. Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111395, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111395>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DEGRANDI-HOFFMAN, G., CHEN, Y., WATKINS DEJONG, E., CHAMBERS, M. L.; HIDALGO, G. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518-2528, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/jee/tov251>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DEGRANDI-HOFFMAN, GLORIA; CHEN, YANPING; SIMONDS, ROGER. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Insects**, v. 4, n. 1, p. 71-89, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/insects4010071>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DORNELES, A. L.; ROSA-FONTANA, A. S.; DOS SANTOS, C. F.; BLOCHTEIN, B. Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. **Environmental Pollution**, v. 272, p. 116414, 2021. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0269749120371037>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DOS SANTOS, C. F.; OTESBELGUE, A.; BLOCHTEIN, B. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PLoS One**, v. 13, p. 1–13, 2018. Available in: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200286>>. Accessed on: 10 Aug. 2021.

FENG, Y.; LUTHRA, A.; DING, K.; YANG, Y.; SAVAGE, J.; WEI, X.; MOESCHTER, R.; AHUJA, S.; VILLEGAS, V.; TORBINA, B.; AHOOJA, A.; ELLIS, T.; BOECHLER, A.; ROBERTS, A. Mid-infrared Spectroscopy Study of Effects of Neonicotinoids on Forager Honey Bee (*Apis mellifera*) Fat Bodies and Their Connection to Colony Collapse Disorder. **bioRxiv**, p. 205112, 2018. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/205112v4>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

FREITAS, B.M.; PINHEIRO, J.N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, p. 282-298, 2010. Disponível em: <<https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/view/8101>>. Acesso em: 10 ago. 2021

GARRATT, M.P.D.; BREEZE, T.D.; JENNER, N.; POLCE, C.; BIESMEIJER, J.C.; POTTS, S.G. Avoiding a bad apple: Insect pollination enhances fruit quality and economic value. **Agric. Ecosyst. Environ.**, n. 184, p. 35-40, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.10.032>>. Acesso em: 10 ago. 2021

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZFONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jee/article-abstract/108/3/849/2380009?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES – IPBES. **Summary for policymakers of the assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production**. Bonn, Germany, 2016. 40 p. Disponível em: <https://ipbes.net/sites/default/files/spm_deliverable_3a_pollination_20170222.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

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

JUNQUEIRA, C.N.; AUGUSTO, S.C. Bigger and sweeter passion fruits: effect of pollinator enhancement on fruit production and quality. **Apidologie**, n. 48, p. 131-140, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-016-0458-2>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

KLEIN, A. M., VAISSIERE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C., & TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B: biological sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MALAGODI-BRAGA, K.S.; KLEINERT, A.M.P. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses? **Aust. J. Agric. Res.**, n. 55, p. 771-773, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/AR03240>>.

MICHENER, C. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. 953 p.

MORTON, V.; STAUB, T. A short history of fungicides. **APSnet Features**, v. 308, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2008-0308>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MULLIN, C. A., FRAZIER, M., FRAZIER, J. L., ASHCRAFT, S., SIMONDS, R., vanENGELSDORP, D.; PETTIS, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS One**, v. 5, n. 3, p. e9754, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MULLIN, C. A.; CHEN, J.; FINE, J. D.; FRAZIER, M. T.; FRAZIER, J. L. The formulation makes the honey bee poison. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 27–35, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.026>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MUSSEN, E. C.; LOPEZ, J. E.; PENG, C. Y. S. Effects of Selected Fungicides on Growth and Development of Larval Honey Bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Entomology**, v. 33, n. 5, p. 1151–1154, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1603/0046-225X-33.5.1151>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 6422843, Pyraclostrobin. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyraclostrobin>>. Acesso em: 25 jul. 2021.

NUNES-SILVA, P.; WITTER, S.; DA ROSA, J.M.; HALINSKI, R.; SCHLEMMER, L. M.; ARIOLI, C.J., RAMOS, J.D.; BOTTON, M.; BLOCHTEIN, B. Diversity of Floral Visitors in Apple Orchards: Influence on Fruit Characteristics Depends on Apple Cultivar. **Neotropical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 511-524, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13744-020-00762-1>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PARREIRA, D.F.; NEVES, W.S.; ZAMBOLIM, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, São Luís, v.3, n.2, p.24-34, 2009. <http://dx.doi.org/10.0000/rtcab.v3i2.36>

PERSCH, T. S. P.; DA SILVA, P. R.; DOS SANTOS, S. H. D.; DE FREITAS, B. S.; OLIVEIRA, G. T. Changes in intermediate metabolism and oxidative balance parameters in sexually matured three-barbeled catfishes exposed to herbicides from rice crops (Roundup®, Primoleo® and Facet®). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 170-179, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.01.004>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; vanENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1-9, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

R CORE Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019.

ROSA-FONTANA, A., DORIGO, A. S., GALASCHI-TEIXEIRA, J. S., NOCELLI, R. C.; MALASPINA, O. What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114849, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114849>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SÁNCHEZ-BAYO, F., & WYCKHUYS, K. A. 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological conservation** 232, 8–27. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SIMON-DELISO, N., SAN MARTIN, G., BRUNEAU, E., MINSART, L. A., MOURET, C.; HAUTIER, L. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e103073, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103073>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

TADEI, R., DOMINGUES, C. E., MALAQUIAS, J. B., CAMILO, E. V., MALASPINA, O., & SILVA-ZACARIN, E. C. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

THERNEAU, T. M. (2015). **A Package for Survival Analysis in R**. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=survival>>. Acesso em: 01 ago. 2021.

THOMPSON, H. M.; FRYDAY, S. L.; HARKIN, S.; MILNER, S. Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops.

Apidologie 45, 545–553 (2014). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-014-0273-6>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; DE OLIVEIRA ORSI, R. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15581-5>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ZHU, W.; SCHMEHL, D. R.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e77547, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077547>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

Material Suplementar



Vídeo-gif do movimento dos espiráculos das larvas, característica utilizada para verificar a sobrevivência das larvas.

3. MANUSCRITO 3

#Este manuscrito será submetido para Saudi Journal of Biological Sciences

A systemic fungicide distort the male genitalia of a stingless bee species

Jenifer Dias Ramos*, Charles Fernando dos Santos, Luísa Cristmann and Betina Blochtein

School of Health and Life Sciences, Graduate Program in Ecology, Evolution and Biodiversity, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

* corresponding author

E-mail: jenifer.ramos@acad.pucrs.br

ABSTRACT

Bees are pollinating insects that substantially contribute to raise the production of many crops. However, due to the usage of pesticides to control pests in modern agriculture, the bees are exposed to a plethora of contaminant substances. The immature bees can be exposed to such substances when they consume contaminated larval food during their development. In this study, we opportunistically evaluated the effects on the size and shape of genitals of *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponini) males exposed to a fungicide associated with an insecticide during larval development. We detected a significant difference on genitalia shape of the exposed males, although the genital size was similar. Nevertheless, the implications of these morphological changes on a reproductive success of *S. bipunctata* males is uncertain, but point to an undesired effect of pesticides on bees.

1. Introduction

Stingless bees are eusocial insects that play an important role in angiosperm reproduction through pollination. This ecosystem service is crucial for maintaining biodiversity (Klein et al. 2007) and contributes quantitatively and qualitatively to food production (Klatt et al. 2013). However, with the intensification of modern agriculture, there has been a significant increase in the use of pesticides around the world (Chakrabarti et al., 2014), which can cause toxic effects on nontarget organisms, such as pollinators (European Commission, 2015).

In this context, Brazil is one of the largest consumers of pesticides in the world, with an increase of 152% over the last 15 years, while the cultivated area has increased by only 8% during the same period (dos Santos et al. 2018). Although fungicides' mechanism of action is very specific, studies have reported their impact on pollinators (Sanchez-Bayo and Goka 2014; Simon-Delso et al. 2017; Carneiro et al. 2020). In addition, there is evidence of an increased toxicity when fungicides and insecticides are used simultaneously (e.g. Papaefthimiou & Theophilidis, 2000, Malaspina et al. 2008, Pinto & Miguel 2008).

In order to evaluate this in a non-*Apis* bee species, we investigated the effects of a fungicide (Carbendazim) associated with an insecticide (Chlorpyrifos) to immatures of *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponini) reared *in vitro*. In experiments designed to artificially rear stingless bee larvae, the emergence of males has not been detected (Baptistella et al. 2012; Menezes et al. 2013; Santos et al. 2015). This may be due to the fact that the stingless bee males are most often produced in small clusters in combs during short periods and commonly in quantities below of 10% (Velthuis et al. 2005), so it is rare to observe them. However, in our study, throughout the observations of larval development and emergence of bees, an unexpected number of males in the control treatments and pesticide exposure treatments was found. Since taking into account that: (i) to date, it is not possible to stimulate an enlarged male production within queen-right colonies and that (ii) the male production per comb is excessively low, then we used emerged individuals for a first record (unprecedented evaluation) of males chronically exposed to a combination of pesticides along their larval development.

2. Materials and methods

We performed a bioassay in triplicate (20 larvae per experiment) totalling 60 larvae to the control and 60 larvae to the treatment with pesticides from March to May, 2019. Bee larvae of 1-3-day, of *Scaptotrigona bipunctata* were reared *in vitro* transferring them to rearing plates and accommodating them into hermetic plastic containers (7×11×17 cm) containing saline solution to control the internal relative humidity. These plates were kept in an incubator at 25 °C (model Luca-161/04, LUCADEMA®, São Paulo, Brazil), in constant darkness (0L:24D). Such larvae were chronically exposed to the commercial formulations of the fungicide Carbendazim (Methylbenzimidazol-2-ylcarbamate) Carbendazim Nortox (50% active ingredient) in association to the insecticide Chlorpyrifos (0,0-diethyl-0-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate) – Lorsban ® 480BR (48% active ingredient) via a contaminated diet (Barbosa et al., 2015). To induce sublethal effects in bees, we handled residual doses of Carbendazim (0,00875 µg a.i./bee; Ramos et al in prep.) associated with Chlorpyrifos (0.0088 µg a.i./bee; Santos et al, 2016) (Table 1). Thus, after the bee emergence the males (n = 16 or 10.66%) were stored in Eppendorf tubes filled with a 70% alcohol solution. After that, their genitals were dissected with tweezers and photographed with a digital camera attached to a stereomicroscope (Leica DMC 2900, Singapore).

We chose 16 landmarks (LMs) for the geometric morphometrics (Figure 1) for which the images were manually digitalized twice by the same researcher using tpsdig2 (Rohlf 2005). The subsequent analyses were performed using the programming language R (Ihaka and Gentleman 1996; R Core Team 2018). The TPS file generated in tpsdig2 with the coordinates of the LMs of the male genitals was used to carry out a generalized Procrustes analysis (GPA) using the function 'gpagen'. This GPA was used within the function 'bilat.symmetry' (Table S1) to extract the symmetric component of the genitalia shape with 'symm.shape'. Then, we plotted a graphic to evaluate the presence of possible outliers, assuming that the low number of available bees could affect the following analyses. However, we did not find any outliers (Figure SI).

Afterwards, we tested the covariation of the shape and size (allometry) of the male genitals using the function 'procD.lm'. Furthermore, we investigated whether both male

groups (control vs. exposed) would have genitals with different sizes (centroid log) and shapes (Procrustes multivariate ANOVA) using the function 'procD.lm'. All these analyses were performed using the package *geomorph* (Adams et al. 2017).

Finally, we performed a canonical variation analysis of the shape with cross-validation adjusted with the jackknife (leave-one-out) method to evaluate the data accuracy and to estimate the error rate between both male groups using the function 'CVA' *Morpho package* (Schlager 2017). We plotted the mean shape (symmetrized) of the male genitals against the mean shape of the control and exposed males using the function 'plotRefToTarget' (Adams et al. 2017). All analyses performed here were permuted 1,999 times.

3. Results and Discussion

Our data indicated no allometry in the genitals of *S. bipunctata* males (logsize), $F = 0.48$, $P = 0.76$; groups, $F = 0.44$, $P = 0.95$, Table S2). We found that the fungicide affected the size of the genitals of *S. bipunctata* males, but neither the insecticide nor the combined action between them (synergic effect) as well as the control showed any effect on such structure (Procrustes regression, $F_{(3,28)} = 3.69$, $P = 0.03$), Figure 2, Table S3. There was a large variation on size of genitalia, except to Carbendazim exposure that had lower variation, but consistently a smaller size as well. However, we detected no significant difference in the genital shapes between the control vs. exposed males (Procrustes MANOVA, $F_{(3,28)} = 1.06$, $P > 0.05$), Figure S2, Tables S4-S5. Our cross-validation analysis demonstrated a low global accuracy for the discrimination between males (18.75%), with control males being poorly (9%) assigned to their correct group. Therefore, in contrast to size, the shape of the male genitalia may be assumed does not suffer with external agents, even though further research are needed in this issue.

Based on our morphological analysis of the genitals of the *S. bipunctata* males exposed or not exposed to the associated action of the fungicide and insecticide, we can assume that the size of the reproductive structure was not affected. Moreover, the shape of the genitals was considerably affected. We found that the distal portion of the penis valve suffered a retraction, while its base externally displaced itself to the body axis. Additionally, the distal portion of gonostylus of the male genitalia exposed to the two types of agrochemicals displaced itself to the central axis of body. Finally, we detected that this

associated exposure to the fungicide and insecticide enlarged gonocoxite compared to those of the non-exposed males (Figure 2).

The male production is a costly investment to the stingless bee because they do not participate in regular colony activities like their sisters, i.e. the workers (Velthuis et al. 2005). Furthermore, the few males occasionally produced by the mother queens are breeding individuals that basically live to mate virgin queens (Velthuis et al. 2005). Therefore, given its crucial role in mating, it is possible to infer that the male genitals are under strong selective pressure to keep both its pattern size and shape once it acts as mating plugs in stingless bees, preventing new copulation by newly-mated queens (Kerr et al. 1962).

Currently, we are working to figure out how to experimentally produce a large number of males of *S. bipunctata* and other stingless bee species on laboratory conditions in order to overcome the restraining imposed by their low natural production. If available, such a procedure will allow us to perform systematized experiments testing not only the male exposing to associated agrochemicals, but also its implications to the reproductive success of *S. bipunctata* males with modified genitalia shapes.

Acknowledgement

We thank Alex Otesbelgue and Cristiane Barros de Andrade for their contribution to the experiments related to this manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests.

CRedit authorship contribution statement

JDR: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft. LC: Data preparation, Data analysis. CFS: Data analysis, Writing. BB: Review, Supervision, Project administration.

References

- Adams DC, Collyer ML, Kaliontzopoulou A, Sherratt E (2017) Geomorph: software for geometric morphometric analyses
- Baptistella AR, Souza CCM, Santana WC, Soares AEE (2012) Techniques for the in vitro production of queens in stingless bees (Apidae, Meliponini). *Sociobiology* 59:297–310
- Carneiro LS, Martínez LC, Gonçalves WG, et al (2020) The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicol Environ Saf* 189:. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>
- dos Santos CF, Otesbelgue A, Blochtein B (2018) The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PLoS One* 13:1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200286>
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 5:299–314
- Kerr WE, Zucchi R, Nakadaira JT, Butolo JE (1962) Reproduction in the social bees (Hymenoptera: Apidae). *J New York Entomol Soc* 70:265–276
- Menezes C, Vollet-Neto A, Imperatriz-Fonseca VL (2013) An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. *Apidologie* 44:491–500. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0197-6>
- R Core Team (2018) R: A language and environment for statistical computing. The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Rohlf FJ (2005) tpsDig, version 2.04. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. Stony Brook
- Sanchez-Bayo F, Goka K (2014) Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS One* 9:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>
- Santos CF, Santos PDS, Blochtein B (2015) In vitro rearing of stingless bee queens and their acceptance rates into colonies. *Apidologie* 47:539–547. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0398-2>
- Schlager S (2017) Morpho and Rvcg - shape analysis in R. In: Zheng G, Li S, Székely G (eds) *Statistical shape and deformation analysis*. Academic Press inc., pp 217–256

Sim, S. Reid, S., 1999. Statistical inference by confidence intervals: Issues of interpretation and utilization.

Physical Therapy, 79, 186-195.

Simon-Delso N, San Martin G, Bruneau E, et al (2017) Toxicity assessment on honey bee larvae of a repeated exposition of a systemic fungicide, boscalid. Bull Insectology 70:83–90

Velthuis HHW, Koedam D, Imperatriz-Fonseca VL (2005) The males of *Melipona* and other stingless bees, and their mothers. Apidologie 36:169–185.
<https://doi.org/10.1051/apido>

Treatment	Dose	Total immature tested	Number of emerged males	Percentage of emerged males
Control	-	60	8	13.3%
Carbendazim	0.00875 µg a.i./bee	60	7	11.6%
Clorpirifós	0.0088 µg a.i./bee	60	6	10.0%
Association/Synergy	0.00875 µg a.i./bee + 0.0088 µg a.i./bee	60	11	18.3%

Table 1. Number of *in vitro* reared larvae of *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) not exposed (control) and exposed to the pesticides Carbendazim (fungicide) and Lorsban (insecticide).

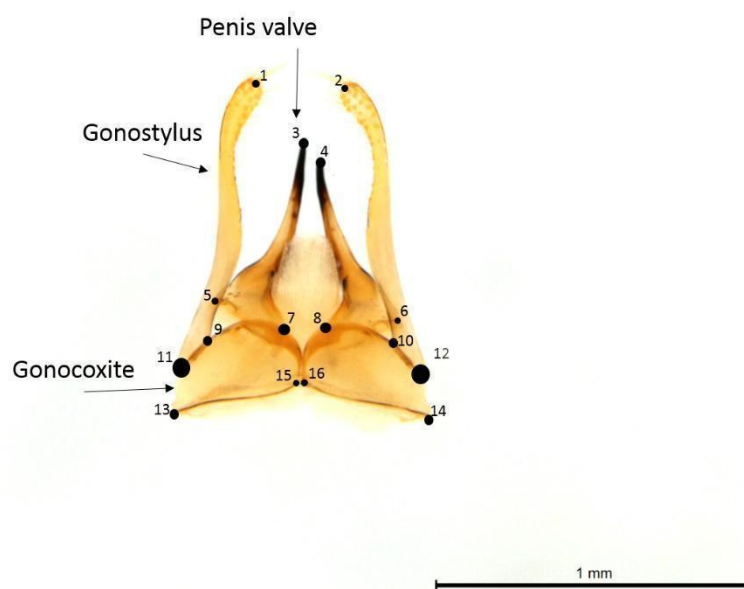


Fig 1. Landmarks ($n = 16$) used to analysis the variation on shape and size of the male genitalia of the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata*.

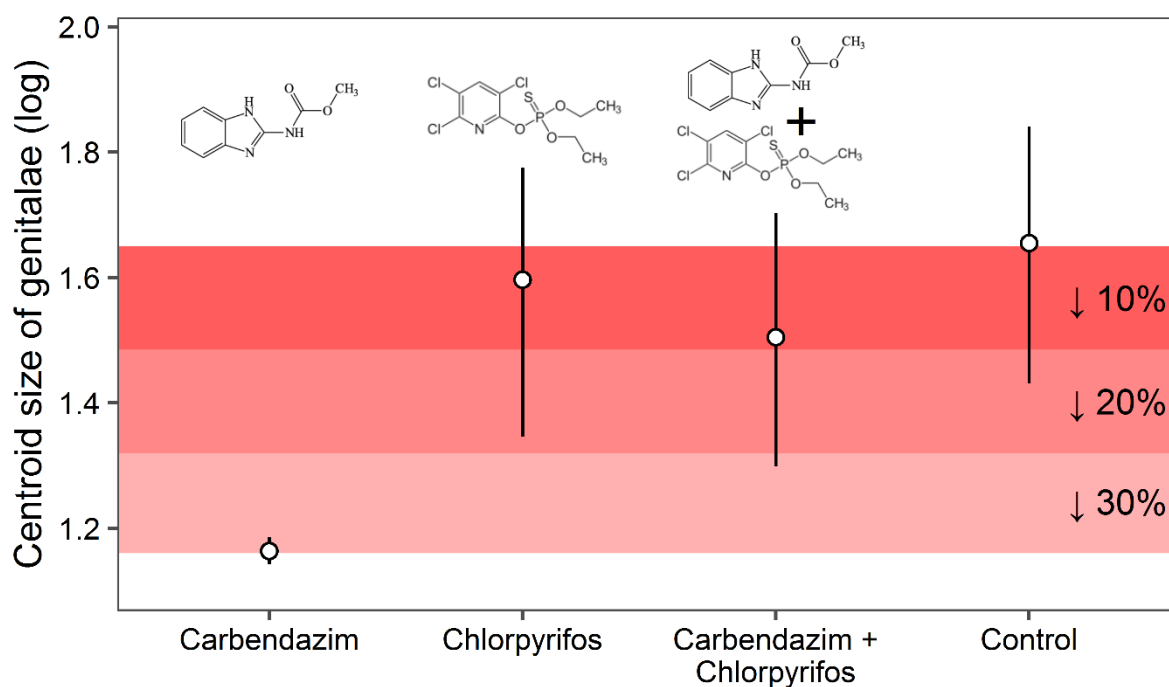


Fig 2. Comparison of the centroid size (log) of the genitalia of males of the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata*. Notes – Centroid indicates the mean (center) of a shape; Points show the average size and vertical lines exhibit the confidence intervals at 95%: Carbendaim = 1.16 (CI 0.03), Chlorpyrifos = 1.59 (CI 0.37), Carbendaim+ Chlorpyrifos (synergic effect) = 1.50 (CI 0.24), Control = 1.65 (CI 0.25); Red gradient exhibits a reduction of genitalia's size each 10%, having the average of control as a baseline. Those average values whose confidence intervals no overlap can be accurately inferred as being statistically different from each other (Sim and Reid, 1999).

Supplementary Material

A systemic fungicide distort the male genitalia of a stingless bee species

Jenifer Dias Ramos*, Charles Fernando dos Santos, Luísa Cristmann and Betina Blochtein

School of Health and Life Sciences, Graduate Program in Ecology, Evolution and Biodiversity,
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

* corresponding author

E-mail: jenifer.ramos@acad.pucrs.br

Tables S1. Procrustes ANOVA. Analysis of directional and fluctuating asymmetry showing the shape variation for genitalia of males of *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).

Factors	Degrees of freedom	Sums of squares	Mean squares	R ²	F-statistic	P
Individual	31	0.143	0.005	0.78	3.82	< 0.001
Side	1	0.002	0.002	0.00	1.31	0.26
individual:side	31	0.037	0.001	0.20		
Total	63	0.182				

individual = variation among individuals; side = directional asymmetry (variation among sides); individual:side = fluctuating asymmetry (variation due to an individual vs. side interaction); R² = indicates the relative contribution of each factor to overall variation; P = associated probability level.

Tables S2. Allometry analysis using size (predictor) vs. shape (response) of the genitalia of males of *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).

Factors	Degrees of freedom	Sums of squares	Mean squares	R ²	F-statistic	P
Size	1	0.001	0.001	0.01	0.48	0.76
Groups	3	0.003	0.001	0.04	0.44	0.95
Size:Groups	3	0.005	0.001	0.07	0.66	0.76
Residuals	24	0.061	0.002	0.86		
Total	31	0.071				

Groups = control males and males exposed to agrochemicals (fungicide: Caberdazim; insecticide: Chlorpyrifos; Synergy between fungicide and insecticide); R² = indicates the relative contribution of each factor to overall variation; P = associated probability level.

Tables S3. Analysis of the size (centroid) of the genitalia of males of *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).

Factors	Degrees of freedom	Sums of squares	Mean squares	R ²	F-statistic	P
Groups	3	0.477	0.159	0.28	3.69	0.031
Residuals	28	1.208	0.043	0.71		
Total	31	1.685				

Groups = control males and males exposed to agrochemicals (fungicide: Caberdazim; insecticide: Chlorpyrifos; Synergy between fungicide and insecticide); R² = indicates the relative contribution of each factor to overall variation; P = associated probability level.

Tables S4. Shape analysis of the genitalia of males of *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini).

Factors	Degrees of freedom	Sums of squares	Mean squares	R ²	F-statistic	P
Groups	3	0.003	0.001	0.05	0.54	0.89
Residuals	28	0.067	0.002	0.94		
Total	31	0.071				

Groups = control males and males exposed to agrochemicals (fungicide: Caberdazim; insecticide: Chlorpyrifos; Synergy between fungicide and insecticide); R² = indicates the relative contribution of each factor to overall variation; P = associated probability level.

Tables S5. Results of the discriminant analysis comparing the Mahalanobis distance between the average shapes of the genitalia of males of *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). Lower: cross-validated classification. Note: Overall classification accuracy = 18.75%. Color indicates lower (yellow), medium (light green) and higher (dark green) percentage. Bold means the percentage of correct classification from actual and its underlying maintenance within it after posterior (ascribed) group.

	Degrees freedom	of Wilks' lambda	F-statistic	P
Groups	3	0.71	1.06	0.4
Residuals	28			
Assigned group				
Actual group	Carbendazim	Chlorpyrifos	Carbendazim + Chlorpyrifos	Control
Carbendazim	57.1%	28.5%	0.00%	14.2%
Chlorpyrifos	0.00%	0.00%	33.3%	66.6%
Carbendazim + Chlorpyrifos	25.0%	12.5%	12.5%	50.0%
Control	9.09%	54.5%	27.2%	9.09%

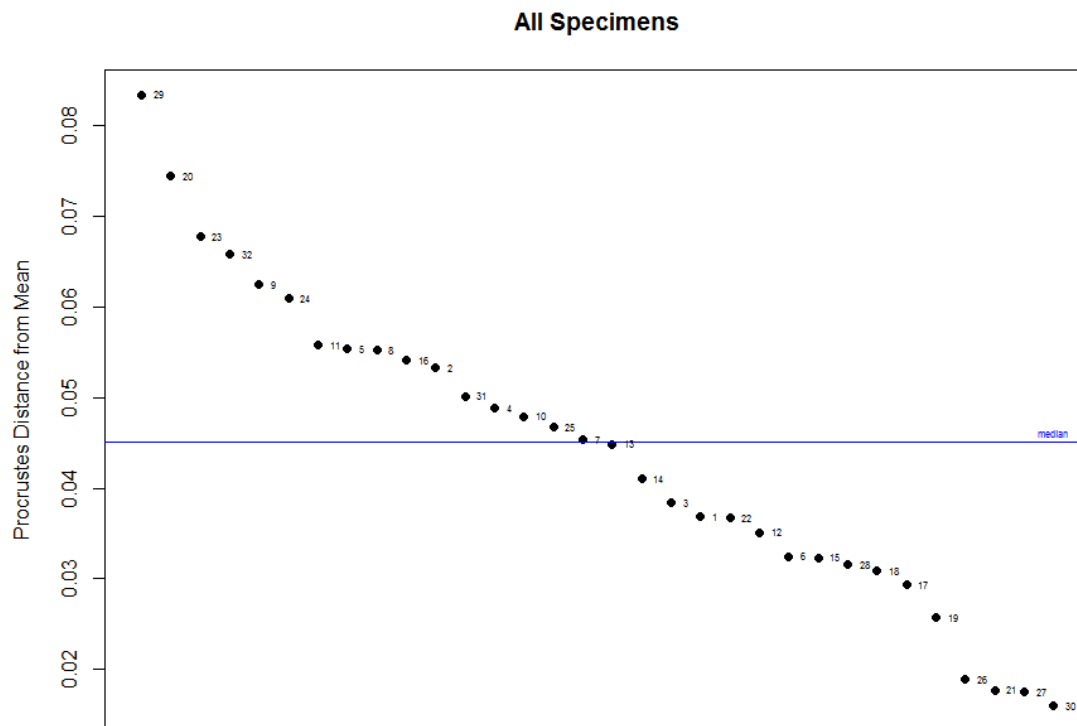


Figure S1. Analysis for potential outliers using all individuals (points) ordered by their Procrustes distance from the mean shape (blue line). Note: upper and lower quartiles are not showed since all individuals were located within them; If any outlier was detected, then it would fall above the upper quartile as red point.

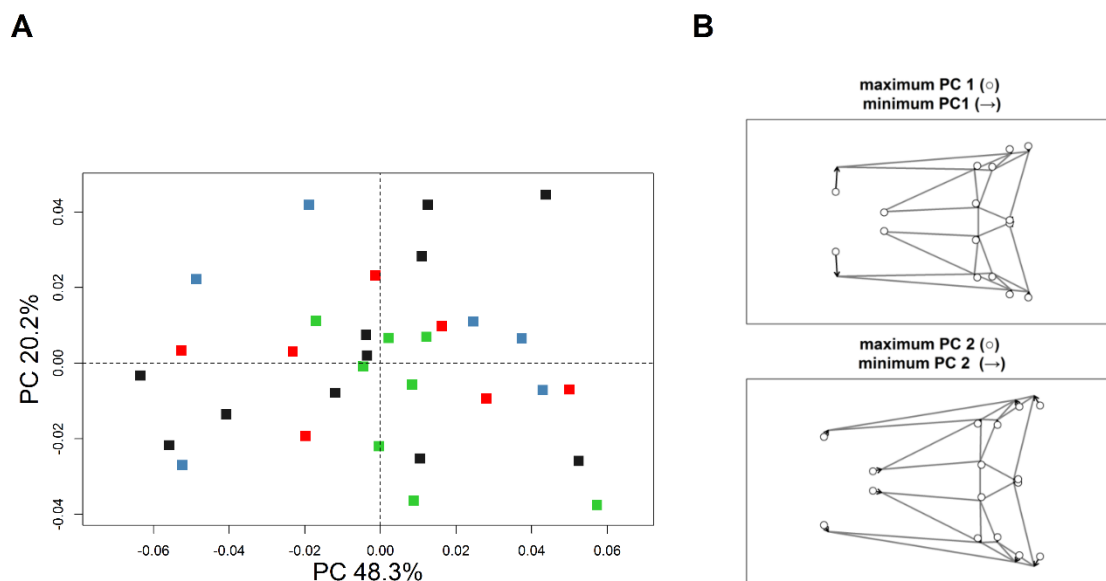


Figure S2. (A) Principal components analyses on Procrustes shape coordinates based on aligned genitalia of males of *Scaptotrigona bipunctata* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). This procedure shows how shape varies along both axes (PC1, PC2) within a multidimensional space. As such, it allows the visualizing of slight changes into shape patterns. Colors: red = Carbendazim, blue = Chlorpyrifos, green = Control, black = synergy (Carbendazim + Chlorpyrifos). (B) A more detailed representation (vectors) on how shape of male genitalia changes. Note: points in both panels (upper, lower) indicate genitalia placed over maximum side in PC1 and PC2, respectively. Similarly, the arrowheads go forward minimum sides in PC1 and PC2. As showed in Table S4 and Table S5, there is no significant difference in shape of genitalia of different groups of males exposed to agrochemicals. In B, shapes were not augmented.

MANUSCRITO 4

Este manuscrito será submetido para a Revista Desenvolvimento e Meio Ambiente. Cabe informar que este capítulo surge do meu interesse e objetivo, ao longo do processo de doutoramento, em integrar a temática sobre agrotóxicos e a conservação dos polinizadores junto aos conhecimentos de Políticas Públicas e a soberania alimentar.

Política brasileira para o serviço ecossistêmico de polinização: entre a reformulação da legislação de agrotóxicos e a soberania alimentar

Jenifer Dias Ramos^{1,3}, Annelise de Souza Rosa-Fontana² e Gabriela Coelho-de-Souza³

¹Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, (Autor correspondente). E-mail: jenifer.ramos@acad.pucrs.br

² Centro de Estudos de Insetos Sociais, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

³ Círculo de Referência em Agroecologia, Sociobiodiversidade, Soberania e Segurança Alimentar Nutricional (AsSsAN Círculo/UFRGS), Departamento de Economia e Relações Internacionais, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Resumo: Frente ao modelo agrícola brasileiro, o qual faz uso intensivo de agrotóxicos com o objetivo de proteção dos cultivos, e na iminência de uma flexibilização na regulação do uso de agrotóxicos, este artigo teve como objetivo caracterizar a política brasileira do serviço ecossistêmico de polinização, a partir do processo de reformulação da legislação de agrotóxicos, analisando o cenário sob o fenômeno da irresponsabilidade organizada. Debates acerca das propostas de alterações na legislação vigente de agrotóxicos surgem sob a justificativa de que a modernização na legislação disponibilizaria produtos ambientalmente mais seguros, são contrastados às preocupações no tocante à saúde humana, as questões ambientais e o agravamento da crise alimentar e ambiental. A partir da perspectiva da política brasileira voltada ao serviço ecossistêmico de polinização, considera-se que até 2017, uma política tímida buscava atender às necessidades de proteção dos polinizadores frente às demandas de regulamentação do uso de novos agrotóxicos. Entretanto, desde 2018, políticas de regulamentação do uso de agrotóxicos passaram a ser implementadas, com grande vigor, usando o argumento da minimização dos riscos e culpabilização dos agricultores pelo mau uso, enfraquecendo modelos de produção de alimentos calcados na agroecologia e na soberania alimentar. Nesse bojo, o artigo caracterizou a orquestração do fenômeno da irresponsabilidade organizada no contexto da regulamentação dos agrotóxicos, no início da década de 2020 no Brasil.

Palavras-chave: avaliação de risco, polinizadores, reformulação de legislação, soberania alimentar

Abstract: Given the Brazilian agricultural model, which makes intensive use of pesticides intending to protect crops, and the imminence of flexibility in the regulation of pesticide use, this article aimed to characterize the Brazilian policy of the pollination ecosystem service, from the process of reformulating pesticide legislation, analyzing the scenario under the phenomenon of organized irresponsibility. Debates about the proposals for changes in the current legislation on pesticides arise under the justification that the modernization of legislation would provide environmentally safer products, are contrasted with concerns regarding human health, environmental issues and the worsening of the food and environmental crisis. From the perspective of the Brazilian policy aimed at the ecosystem service of pollination, it is considered that until 2017, a timid policy sought to meet the protection needs of pollinators in the face of demands for regulation of the use of new pesticides. However, since 2018, policies to regulate the use of pesticides have been implemented, with great vigor, using the argument of minimizing risks and blaming farmers for their misuse, weakening food production models based on agroecology and food sovereignty. In this context, the article characterized the orchestration of the phenomenon of irresponsibility organized in the context of pesticide regulation in the early 2020s in Brazil.

Key-words: Risk assessment, pollinators, reformulation of legislation, food sovereignty

1. Introdução

Durante o período de 1960-1980, foram implementados no Brasil pacotes tecnológicos voltados a modernizar e otimizar a produção agrícola. Este período ficou conhecido como Revolução Verde e teve como pilares a mecanização da agricultura, o uso de sementes transgênicas, os créditos agrícolas subsidiados e a isenção de tributos fiscais, bem como o incentivo ao uso de agrotóxicos para proteção das lavouras contra possíveis pragas (Carneiro et al, 2015). No que tange a produção agrícola, destaca-se a importância do serviço ecossistêmico de polinização realizado pelos polinizadores, especialmente as abelhas, as quais são responsáveis pela polinização de 80% das plantas cultivadas ou silvestres, sendo polinizadoras exclusivas de 65% dessas culturas agrícolas (IPBES, 2019). Todavia, tem sido evidenciado o declínio das populações de abelhas, pois embora seja um fenômeno de causa

multifatorial, destaca-se a contribuição do uso de agrotóxicos para este declínio (Goulson et al., 2015).

Rachel Carson, em seu livro “Primavera Silenciosa”, publicado em 1962, já discutia e expunha a prática agrícola após a Segunda Guerra Mundial, pontuando que os agrotóxicos possuem efeito prejudicial a vidas humanas e não humanas. Embora este seja o entendimento para boa parte da comunidade científica, ainda assim trata-se de uma temática polêmica e polarizada. Para Goldblatt (1996), isso é uma expressão do fenômeno da irresponsabilidade organizada, definida como o conjunto dos “mecanismos culturais e institucionais pelos quais as elites políticas e econômicas encobrem efetivamente as origens e consequências dos riscos e perigos catastróficos da recente industrialização” (Ibidem, p. 241). Ou seja, os estados e atores privados ocultam os efeitos dos riscos, passando à sociedade uma ideia de risco controlado ou até mesmo inexistente.

É sob este contexto que buscasse reformular a Legislação de Agrotóxicos 7.802/1989, trazendo incertezas e questionamentos aos diversos atores da sociedade, acerca da natureza nociva dos produtos químicos sobre a saúde humana e ao meio ambiente. Diante deste cenário, este artigo buscou caracterizar a política brasileira de serviço ecossistêmico de polinização, a partir do processo de reformulação da legislação de agrotóxicos, analisando o cenário sob o fenômeno da irresponsabilidade organizada. Para tanto, o artigo está organizado em quatro seções, além desta introdução. Na segunda seção apresenta-se o declínio de polinizadores, discutindo-se a política brasileira de serviço ecossistêmico de polinização, utilizando como modelo as abelhas. Na terceira seção é discutida a proposta sobre a nova regulamentação de agrotóxicos, destacando-se as posições dos atores sociais. Na quarta seção discute-se a relevância do serviço de polinização prestado pelas abelhas no contexto da agroecologia e soberania alimentar. Por fim, apresentam-se as conclusões.

2. O declínio de polinizadores: o Brasil e as políticas de proteção às abelhas

A importância das abelhas para o equilíbrio dos ecossistemas e para a produção de alimentos humana é globalmente reconhecida. No entanto, nas últimas décadas, o que se tem observado são declínios acentuados em populações destes organismos (Potts et al., 2010; Gianini et al., 2017; Pires e Maués, 2020). São muitas as causas das perdas de

populações de abelhas, a exemplo de perda de habitats por uso intensivo de terras agrícolas, espécies invasoras, patógenos, mudanças climáticas e agrotóxicos (IPBES, 2019). Dessa forma, é inviável atribuir as perdas de abelhas a uma única causa, no entanto, uma delas tem sido investigada e associada a vários casos: o uso de agrotóxicos. O próprio sindicato das empresas produtoras, a partir do projeto de monitoramento de agrotóxicos “Colmeia Viva”, reconheceu e atribuiu à grande mortandade de abelhas no Estado de São Paulo ao uso incorreto de produtos químicos (MAP, 2017). Além disso, são numerosos os relatos e trabalhos científicos apontando os efeitos letais e subletais dos agrotóxicos para as abelhas (Pettis et al., 2013; Rosa et al., 2016; dos Santos et al., 2018; Tadei et al., 2019; Dornelles, et al., 2021)

Como política de proteção aos polinizadores, em 2017, o IBAMA publicou a Instrução Normativa (IN 02/2017), que regulamenta a utilização de abelhas em avaliação de risco de agrotóxicos (ARA), baseando-se no modelo estadunidense, estabelecido pela “United States Environmental Protection Agency (EPA)” – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos. Com isso as novas moléculas a serem lançadas no mercado precisam passar por testes com abelhas, isso representou um potencial avanço para conservação dos polinizadores nativos. Paralelamente, foi publicado um manual cujo objetivo foi apresentar as bases conceituais da avaliação de risco de agrotóxicos e as orientações gerais sobre os novos procedimentos de avaliação, alterados com a publicação da IN (Cham et al., 2017).

A espécie utilizada como padrão para as avaliações de risco de agrotóxicos é a *Apis mellifera*, exótica no Brasil. No entanto, é importante destacar que o Brasil abriga a maior diversidade de abelhas-sem-ferrão do mundo (Michener, 2013) e, que, dessa forma, é essencial considerar espécies nativas em ARA. Neste contexto, o IBAMA lançou no mesmo ano uma nota técnica, questionando a segurança da utilização de uma espécie exótica como substituta das demais espécies nativas do Brasil (abelhas-sem-ferrão), apontando também as principais lacunas de conhecimento que ainda inviabilizam a inclusão de abelhas sem ferrão em ARA (IBAMA, 2017).

As preocupações acerca da perda de polinizadores também conduziram esforços internacionais para a proposição de políticas públicas que auxiliem os governos a adotarem medidas de proteção a organismos que tenham participação direta na produção de alimentos. A partir da Plataforma Intergovernamental para Biodiversidade e Serviços

Ecosistêmicos (IPBES) foram reunidos pesquisadores do Brasil, Reino Unido, Suécia, México, Austrália, Argentina e Japão, os quais elaboraram medidas capazes de auxiliar a conservação dos polinizadores. Dentre essas medidas, encontra-se o fortalecimento dos padrões regulatórios de agrotóxicos, cuja implementação está sendo acompanhada desde a publicação da IN 02/2017 pelo IBAMA.

Portanto, pode-se considerar que até 2017, vinha sendo aplicada no país uma política que buscava de forma bastante tímida atender às necessidades de proteção dos polinizadores. Desde 2018, uma nova proposta passou a ser tramitada no âmbito federal, a qual está sendo apresentada na seção a seguir.

3. Nova regulamentação de agrotóxicos no Brasil: divergências entre apoiadores e críticos

O Brasil se destaca globalmente sob duas principais vertentes: por ser uma das maiores potências agrícolas e um dos maiores consumidores de agrotóxicos (Carneiro, 2015), este último, justificando-se pelo fato de que o clima tropical dificulta o controle de pragas agrícolas, já que não há invernos rigorosos que quebrem os ciclos de desenvolvimento, como ocorre em regiões de clima temperado. Além disso, o sistema de grandes monoculturas utilizado no Brasil altera o equilíbrio dos ecossistemas, culminando no aumento da proliferação de pragas e doenças (Vasconcelos, 2018).

De acordo com a legislação vigente (Lei Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989), que regulamenta o uso de agrotóxicos no Brasil, o termo “agrotóxico” inclui: (a) “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”; e (b) “substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Partindo dessas premissas, debates acerca das propostas de nova regulamentação de agrotóxicos vêm se intensificando, sobretudo desde 2018, quando o Projeto de Lei nº 6.299/2002 foi aprovado em uma comissão da Câmara dos Deputados. A proposta altera os

artigos 3º e 9º da Lei nº 7.802, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências (Câmara, 2002).

Os apoiadores da mudança na legislação, especialmente os fabricantes de agrotóxicos, as associações ligadas ao agronegócio e o próprio Ministério da Agricultura, apontam que é preciso modernizar a lei vigente. Eles alegam que o processo para registro de novas moléculas no Brasil é muito lento, tornando obsoletas as tecnologias avançadas que seriam, segundo eles, seguras. A Embrapa (2018) se posicionou de forma favorável às alterações, alegando que a proposta apresenta avanços em relação à legislação atual. A diretoria executiva afirma que:

“Destaca-se que os avanços devem se dar à luz do melhor conhecimento disponível, para que a proposta traga maior celeridade ao processo de registro de agrotóxicos, com garantia à disponibilidade de ferramentas adequadas para o manejo fitossanitário da produção agropecuária brasileira e, ao mesmo tempo, assegure a minimização de riscos à saúde da população, dos agricultores e do meio ambiente”.

Em oposição estão as organizações ligadas à saúde, como a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (Abrasco), o Instituto Nacional de Câncer e órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), do Ministério da Saúde, e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), além de entidades ambientalistas, como o Greenpeace. Os referidos oponentes alegam que esse conjunto de propostas de alterações, batizado de “Pacote do Veneno”, irá potencializar a flexibilização de um mercado que já é bastante permissivo. Isso traria consequências sérias com relação aos riscos à saúde pública e agravaria o quadro de contaminação ambiental. De acordo com Fernando Carneiro, pesquisador da Fiocruz Ceará e membro da Abrasco, as alterações da PL irão aumentar os riscos e acelerar o registro sem qualidade, permitindo que agrotóxicos mais perigosos cheguem ao mercado brasileiro. A Anvisa (2018) também se opôs à mudança da lei, alegando que o PL não contribui com a melhoria, disponibilidade de alimentos mais seguros ou novas tecnologias para o agricultor, e nem mesmo com o

fortalecimento do sistema regulatório de agrotóxicos, não atendendo, dessa forma, a quem deveria ser o foco da legislação: a população brasileira.

A discussão vem causando embate entre os diversos segmentos mencionados. As principais divergências concentram-se em quatro pontos principais. O primeiro deles é em relação à nomenclatura. Atualmente, a legislação brasileira refere-se às substâncias usadas no combate a pragas agrícolas como “agrotóxico” (Lei nº 7.802/89). A indústria discorda da nomenclatura, alegando que o termo “pesticida” é globalmente utilizado para designar as substâncias (Vasconcelos, 2018). A mudança na nomenclatura ainda propõe como alternativa os termos “defensivo fitossanitário” ou “produtos de controle ambiental”. Os oponentes à alteração defendem que a nomenclatura tem por objetivo desfazer a associação entre os agrotóxicos e a toxicidade e os riscos à saúde e ao ambiente associados a eles.

O segundo ponto é referente à competência para o registro de novos agrotóxicos. De acordo com a legislação vigente, a responsabilidade é de competência de três esferas governamentais: o Ministério da Agricultura é responsável pela análise da eficiência agrônômica do produto; à Anvisa cabe avaliar a toxicidade do produto e os riscos para a saúde humana; e o Ibama é incumbido da análise dos riscos relacionados ao meio ambiente. O veto de um dos três é suficiente para barrar a aprovação e liberação de um novo agrotóxico. No quesito de competência, o texto da proposta no PL nº 6.299/02 menciona que Anvisa e Ibama podem avaliar e, quando couber, homologar a decisão. No entanto, não deixa claro termos específicos como “vetar”. Assim, os contrários alegam que a decisão final sobre liberar ou não determinada substância ficaria a cargo apenas do Ministério da Agricultura, cabendo à Anvisa e ao Ibama um papel menor no processo, podendo apenas propor uma recomendação (e não um veto), no caso de discordância. Os defensores da PL nº 6.299/02 discordam e garantem que nada mudaria com relação ao processo de aprovação. Segundo eles, a centralização do processo pelo Ministério da Agricultura, sem redução do poder de decisão dos demais parceiros, objetiva conferir agilidade ao processo de registro, a fim de fornecer à sociedade e ao meio ambiente, produtos relativamente seguros.

O terceiro ponto consiste no critério de avaliação usado na análise de novos produtos. De acordo com o artigo 3º da legislação vigente (Lei nº 7.802/1989), “fica proibido o registro de agrotóxicos, seus componentes e afins que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de

experiências da comunidade científica. ” Esta etapa é chamada avaliação de periculosidade. Assim, a legislação brasileira e suas normas regulamentadoras consideram que a identificação do perigo em causar tais danos à saúde é suficiente para que determinada substância não seja registrada no Brasil. A proposta em análise no Congresso (PL 6.299/2002) propõe que, no lugar da avaliação de periculosidade”, se adote a avaliação de risco, que, além da toxicidade do produto, considera a forma de utilização, as condições climáticas durante a aplicação, o tempo de exposição ao agrotóxico, entre outros fatores.

Pesquisador da Embrapa Agropecuária Oeste, Rômulo Scorza Júnior, aponta parecer favorável da Instituição à alteração proposta no PL 6.299/2002, em relação ao terceiro ponto. Ele explica que a parte inerente ao IBAMA no processo de avaliação ambiental compreende duas vertentes: Avaliação do Potencial Periculosidade Ambiental (PPA) e a Avaliação de Risco Ambiental (ARA). De acordo com o pesquisador, a PPA se baseia apenas na toxicidade inerente ao agrotóxico e em alguns testes realizados em laboratório, sendo uma característica intrínseca da molécula do agrotóxico, não se levando em consideração as condições ambientais ou se organismos não alvo serão expostos com base na forma de uso. A ARA seria então mais completa, já que, além de abranger os pressupostos da PPA, também considera a ocorrência ou não da exposição, bem como os níveis de exposição. Além disso, a ARA de agrotóxicos leva em consideração o modo e a época de aplicação do agrotóxico, a cultura agrícola e condições ambientais. Para ele, a ARA do agrotóxico traz mais realismo no processo regulatório, pois é baseado em ciência. Dessa forma, a incorporação da avaliação de risco como ferramenta de tomada de decisão, proposta no PL, tornaria a PPA uma fase preliminar da ARA, que passa a ser obrigatória no processo de registro (EMBRAPA,2019).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018), ligado à saúde pública, repudiou veemente tal alteração. Em nota pública de posicionamento, manifestaram que a revogação da Lei nº 7.802/1989 e a implementação do PL 6.299/2002 possibilitará o registro de agrotóxicos com características teratogênicas, mutagênicas e carcinogênicas, colocando em risco a saúde da população exposta a esses produtos e o meio ambiente.

A professora geógrafa da Universidade de São Paulo (USP) e autora do atlas Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia, Larissa Bombardi, manifestou apoio às instituições contrárias ao PL 6.299/2002. Ela pontua ser inaceitável que se comercialize no país substâncias com essas características de periculosidade. Se a lei

vigorar, os mais afetados serão os trabalhadores rurais, as populações que vivem em áreas próximas ao uso intensivo de agrotóxicos e a população em geral. Para Bombardi, se o intuito do PL é modernizar a lei, como os favoráveis afirmam, seria importante estabelecer um período para a validade do registro dos agrotóxicos, com reavaliações de tempos em tempos. A cada 10 e 15 anos, União Europeia e Estados Unidos, respectivamente, têm os agrotóxicos reavaliados. No Brasil não há nenhuma política de reavaliação neste sentido (Vasconcelos, 2018).

Há divergências também quanto ao prazo para aprovação dos agrotóxicos. Conforme mencionado anteriormente, de acordo com a legislação em vigência, a aprovação de um novo agrotóxico no Brasil depende da análise do IBAMA, ANVISA e MAPA. O PL prevê a concessão de registro temporário e autorização temporária, por decurso de prazo. Mais especificamente, estabelece que os produtos analisados terão um registro temporário automático após 24 meses do início da análise pelos órgãos registrantes, ainda que sem um parecer final, desde que já tenham sido aprovados em pelo menos três países integrantes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE).

Representantes do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (Sindiveg), favoráveis às alterações, alegam que no Brasil, um novo produto leva, aproximadamente, oito anos para ser aprovado e registrado. Em outros países como EUA e Austrália leva apenas dois anos. Em oposição, as autoridades do IBAMA defendem que não é possível considerar as mesmas conclusões sobre avaliação de risco ao meio ambiente entre países com condições ambientais e de campo tão distintas.

Adicionada a essas diferenças (ambientais e de campo) temos a influência do cenário político-econômico para cada país. No Brasil, nas últimas duas décadas foram liberados 4.051 novos pesticidas e substâncias para a agricultura (MAPA,2020), no entanto mais da metade (2.097 agrotóxicos e componentes industriais) foram aprovados nos últimos 5 anos. Desde a saída da presidenta Dilma Rouseff, em agosto de 2016, seguida da posse do presidente Michel Temer, observamos um aumento na liberação de agrotóxicos, sugere-se que o estreitamento de laços com a Frente Parlamentar da Agropecuária (bancada ruralista), a qual na legislatura atual conta com 257 signatários no Congresso, e 32 cadeiras no Senado, tenha contribuído para essa liberação. No atual governo, instituído em 2018 e comandado pelo presidente Jair Bolsonaro, já foram aprovados 1.130 agrotóxicos. Cabe elucidar que a maioria

dos produtos liberados são os denominados genéricos, pois já possuem uma composição similar a substâncias aprovadas pelo Ministério da Agricultura, pela Anvisa e pelo IBAMA.

Diante deste panorama, vivemos momentos críticos para inserção e tensionamento de uma agenda voltada à conservação dos polinizadores, especialmente as abelhas. Embora em 2017, havíamos avançado com a publicação da portaria do IBAMA nº 84/1996, instrução normativa nº 2/2017 - BRASIL, a qual prevê testes ecotoxicológicos em organismos terrestres, entre eles abelhas adultas e em larvas, para avaliação de risco de um agrotóxico a ser registrado (CHAM et al., 2017). A realidade atual contextualizada acima não nos confere segurança ou perspectiva de proteção aos polinizadores, uma vez que vivemos a ampliação do uso de agrotóxicos no campo e não a sua mitigação.

4. Produção de alimentos: a interface entre agroecologia, soberania alimentar e a polinização

Durante o processo de modernização da agricultura até o modelo agrícola hegemônico atual, o agronegócio, acompanhamos a mudança de dinâmica no meio rural, e o agravamento dos problemas ambientais. A inserção dos domínios mercadológicos nos sistemas de cultivos ocasionou a ampliação do uso de agrotóxicos no Brasil, inclusive muitas vezes sem fiscalização. Tal uso trouxe consequências ambientais, risco de contaminação para água, animais aquáticos e terrestres, bem como para a população rural e para os consumidores de alimentos submetidos à aplicação destes produtos (Bombardi, 2018;2021).

Em resposta a esse modelo agrícola convencional e produtivista que estava e está em expansão, surge como alternativa a Agroecologia compreendida como ciência, prática, e movimento social (Wezel, 2009). Segundo Caporal et al. (2007), a Agroecologia se apresenta como uma ciência integradora, que reconhece e se nutre dos saberes, conhecimentos e experiências dos agricultores, dos povos indígenas e dos demais atores sociais envolvidos em processos de desenvolvimento rural. A Agroecologia traz uma proposta de manejo da terra ampliado, que leva em consideração a sustentabilidade ecológica, a não utilização de agrotóxicos, a soberania alimentar, a viabilidade econômica, a conservação de recursos, a equidade social e a produtividade (Caporal et al., 2007).

Diante disso, destaca-se a importância da transição agroecológica, a qual pode ser compreendida como a passagem de uma agricultura baseada no uso de agrotóxicos e energia externa para uma agricultura focada em agroecossistemas sustentáveis (Altieri, 2012). O conceito de transição agroecológica, é entendido como:

“Um processo gradual e multilinear de mudança, que ocorre através do tempo, nas formas de manejo dos agroecossistema, que, na agricultura, tem como meta a passagem de um modelo agroquímico de produção (que pode ser mais ou menos intensivo no uso de *inputs* industriais) a estilos de agriculturas que incorporem princípios e tecnologias de base ecológica. Essa ideia de mudança se refere a um processo de evolução contínua e crescente no tempo, porém sem ter um momento final determinado. Entretanto, por se tratar de um processo social, isto é, por depender da intervenção humana, a transição agroecológica implica não somente na busca de uma maior racionalização econômico-produtiva, com base nas especificidades biofísicas de cada agroecossistema, mas também numa mudança nas atitudes e valores dos atores sociais em relação ao manejo e conservação dos recursos naturais”. (Caporal e Costabeber, 2004).

Neste contexto de transição agroecológica e equilíbrio ambiental, o serviço ecossistêmico de polinização, realizado especialmente por abelhas, se destaca devido a sua contribuição para a produção de alimentos, nos aspectos quanti e qualitativos, podendo ser vislumbrado como uma estratégia sustentável de produção (Wolowski et al., 2019), tendo em vista a máxima “como alimentar 10 bilhões de pessoas até 2050? “. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, “Food and Agriculture Organization”) reconhece a produção de frutos e sementes em maior quantidade e com melhor qualidade quando polinizadas adequadamente (Roubik, 2018).

Ainda referente a pauta de alimentação cabe observar dados divulgados recentemente pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) referente a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2016-2017), onde após consulta de 68,9 milhões domicílios de todas as regiões do país, apontou que 36,7% (o equivalente a 25,3 milhões) estavam com algum grau de Insegurança Alimentar¹.

¹ (IA): IA leve (24,0%, ou 16,4 milhões), IA moderada (8,1%, ou 5,6 milhões) ou IA grave (4,6%, ou 3,1 milhões). A pesquisa ainda aponta que, na população residente, estimada em 207,1 milhões de habitantes, 84,9 milhões habitavam aqueles domicílios com alguma IA - 56 milhões em domicílios com IA leve, 18,6 milhões em

Diante de um cenário de insegurança alimentar, e tensionamentos sociais de diversos setores surge o conceito de “Soberania Alimentar”, termo cunhado pela Via Campesina, no Fórum Mundial sobre Soberania Alimentar de Nyélény, adotado em 2001, é definido como:

“O direito dos povos a alimentos nutritivos e culturalmente adequados, acessíveis, produzidos de forma sustentável e ecológica, e seu direito a decidir seu próprio sistema alimentar e produtivo. Isto coloca aqueles que produzem, distribuem e consomem alimentos no coração dos sistemas e políticas alimentares, por cima das exigências dos mercados e das empresas. Defende os interesses e inclui as futuras gerações. Nos oferece uma estratégia para resistir e desmantelar o comércio livre e corporativo e o regime alimentar atual, e para canalizar os sistemas alimentares, agrícolas, pastoris e de pesca para que passem a ser gerenciados pelos produtores e produtoras locais. A soberania alimentar dá prioridade às economias locais e aos mercados locais e nacionais, e outorga o poder aos camponeses e à agricultura familiar, à pesca artesanal e ao pastoreio tradicional, e coloca a produção alimentar, a distribuição e o consumo sobre a base da sustentabilidade do meio ambiente, social e econômica. A soberania alimentar promove o comércio transparente, que garante renda digna para todos os povos, e o direito aos consumidores para controlar sua própria alimentação e nutrição. Garante que os direitos de acesso e gestão da nossa terra, de nossos territórios, nossas águas, nossas sementes, nosso gado e a biodiversidade, estejam nas mãos daqueles que produzem os alimentos. A soberania alimentar supõe novas relações sociais livres de opressão e desigualdades entre os homens e mulheres, povos, grupos raciais, classes sociais e gerações (DECLARAÇÃO DE NYÉLÉNI, 2007)”.

Alinhado a isso, Hespanhol (2006), destacou que para que ocorra o processo de transição agroecológica é necessário envolvimento participativo e uma maior sensibilização ambiental de todos os atores da cadeia tendo em vista que a transição agroecológica não é uma reforma pontual nas técnicas de produção agrícola, mas uma mudança estrutural para um modelo capaz de respeitar os princípios socioambientais. Diante disso, destaca-se os desafios pelos quais essa transição é atravessada: (a) apoio técnico aos agricultores

domicílios com IA moderada e 10,3 milhões em domicílios com IA grave (IBGE, 2020). Além disso, de forma paradoxal ao olharmos para a área rural, onde se desenvolve a agricultura, observamos que os índices de Insegurança Alimentar foram proporcionalmente mais expressivos do que nos domicílios urbanos, respectivamente: IA grave de 7,1%, e 4,1%.

interessados na transição, tendo em vista a forte atuação da agricultura industrial (convencional) - para o uso de seus pacotes tecnológicos; (b) amparo governamental, por meio de créditos e uma legislação atuante nas esferas municipais, estaduais e federal, a fim de fortalecer a expansão dos alimentos agroecológicos a partir de oportunidades de mercado e dedução de impostos (c) trocas justas entre produtores e mercado, com o objetivo de ultrapassar as dificuldades da comercialização e aumentar acesso dos produtos agroecológicos ao consumidor; (d) leis capazes de agregar um maior número de produtores e não apenas relacionadas em definir limites para a produção alternativa ou exigências para tornar-se um agricultor orgânico; e por último (e) a carência de mecanismos jurídicos e econômicos que possam alavancar a produção agroecológica. Em resumo, os desafios para a transição do modelo convencional para o agroecológico devem principalmente romper gradualmente com o “pacote” de agrotóxicos e industrial da revolução verde, e ao mesmo passo fortalecer a agricultura de base familiar, bem como as ações de protagonismo popular, gerando uma sociedade sustentável em seus diversos aspectos.

Contudo, a alimentação deve ser um direito humano e, independentemente do sistema político do país, as políticas públicas são essenciais para o alcance da soberania alimentar (Barichello et al., 2021). Entendemos dessa forma a forte relação do modelo agroecológico e sua potencialidade de promover a conservação dos polinizadores, em função do uso de estratégias biológicas que substituem o uso de agrotóxicos e que são compatíveis com a vida dos polinizadores. Modelos de produção de alimentos que promovem a biodiversidade, se constituem como o primeiro elo de sistemas alimentares sustentáveis, justos e equitativos.

Conclusão

A partir da perspectiva das políticas brasileiras voltadas ao serviço ecossistêmico de polinização, considera-se que até 2017, uma política tímida buscava atender às necessidades de proteção dos polinizadores frente às demandas de regulamentação do uso de novos agrotóxicos. Entretanto, desde 2018, políticas de regulamentação do uso de agrotóxicos passaram a ser implementadas, com grande vigor, usando o argumento da minimização dos riscos e culpabilização dos agricultores pelo mau uso. Nesse bojo, o artigo descreveu a

orquestração do fenômeno da irresponsabilidade organizada no contexto da regulamentação dos agrotóxicos, no início da década de 2020 no Brasil.

Além disso, o presente artigo apontou as principais consequências de uma reformulação na legislação de agrotóxicos, sob distintos pontos de vista, avaliando o quanto a política brasileira para os serviços de polinização está sendo enfraquecida, fortalecendo um modelo de produção de alimentos concentrador de capital, excludente e com graves impactos sobre os solos, água, biodiversidade, tendendo a um modelo de dependência alimentar, se contrapondo à soberania alimentar. Essa situação impede a ascensão do modelo agroecológico, o qual apresenta potencial para uma produção de alimentos isenta de agrotóxicos, capaz de estar associado ao serviço ecossistêmico de polinização, e em diálogo com diversos atores sociais desde a produção e comercialização dos produtos até os consumidores.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Entidade divulga moção de apoio à Anvisa referente à proposta em tramitação no Congresso Nacional que retira do órgão a competência de realizar reavaliação toxicológica de agrotóxicos. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2018/ccvisa-e-contra-o-pl-6299>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ALTIERI, M. **Agroecologia - bases científicas para uma agricultura sustentável**. 3 ed. São Paulo: Expressão Popular, 2012. 400p

BARICHELLO, R. The Challenge of Achieving Food Security. In: **Current Issues in Global Agricultural and Trade Policy: Essays in Honour of Timothy E Josling**. 2021. p. 111-133.

BRASIL. Instrução Normativa nº 2, de 9 de fevereiro de 2017. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, ano 154, n. 33, p. 33-36, 10 fev. 2017. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=10/02/2017&jornal=1&pagina=33&totalArquivos=88>>. Acesso em: 05 jul 2021.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Nota Técnica 02001.000062/2017-93. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 23 jan. 2017. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/noticias/noticias2017/nota_tecnica_avaliacao_d_e_risco_de_agrotoxicos.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

BRASIL. Senado Federal. **PL 6299/2002**. Altera os arts 3º e 9º da Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e

rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. 2002.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. (Orgs.). **Agroecologia e Extensão Rural Sustentável: Contribuições para a Promoção do Desenvolvimento Rural Sustentável**. Brasília: MDA/SAF/DATER/IICA, 2004. 166 p.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A.; PAULUS, G. **Agroecologia: matriz disciplinar ou novo paradigma para o desenvolvimento rural sustentável**. 2006. Disponível em: <<https://www.portalces.org/sites/default/files/migrated/docs/1211.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. DA S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. **Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. Disponível em: <https://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wp-content/uploads/2013/10/DossieAbrasc_o_2015_web.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CARSON, R. **Primavera Silenciosa**. São Paulo: Gaia, 2010. 340 p.

CHAM, K. de O.; REBELO, R. M.; OLIVEIRA, R. de P.; FERRO, A. A.; VIANASILVA, F. E. de C.; BORGES, L. de O.; SARETTO, C. O. S. D.; TONELLI, C. A. M.; MACEDO, T.C. **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. Brasília: Ibama/Diqua, 2017. 105 p. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/reavaliacao-ambiental/2017/2017-07-25-Manual-IBAMA-ARA-Abelhas-IN0217-WEB.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

DORNELES, A. L.; ROSA-FONTANA, A. S.; DOS SANTOS, C. F.; BLOCHTEIN, B. Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. **Environmental Pollution**, v. 272, p. 116414, 2021.

DOS SANTOS, C. F. dos; OTESBELGUE, A.; BLOCHTEIN, B. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PLoS One**, v. 13, p. 1–13, 2018. Available in: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200286>>. Accessed on: 10 Aug. 2021.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Política de Defensivos Fitossanitários e de Produtos de Controle Ambiental, seus Componentes e Afins. Esclarecimentos Oficiais. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/esclarecimentos-oficiais/-/asset_publisher/TMQZKu1jxu5K/content/tema-esclarecimentos-sobre-o-substitutivo-do-projeto-de-lei-n-6-299-de-2002-politica-de-defensivos-fitossanitarios-e-de-produtos-de-controle-ambiental>. Acesso em: 5 de ago. 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Processo regulatório e análise de risco ambiental de agrotóxicos**. Brasília, 2019. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/45089489/artigo-processo-regulatorio-e-analise-de-risco-ambiental-de-agrotoxicos.pdf>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Pollination of Cultivated Plants: A Compendium for Practitioners**. Rome, Italy: FAO, 2018. 324 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/documents/card/en/c/i9201en>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

GIANNINI, T. C.; COSTA, W. F.; CORDEIRO, G. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; BIESMEIJER, J.; GARIBALDI, L. A. Projected climate change threatens pollinators and crop production in Brazil. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0182274, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182274>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

GOLDBLATT, David. **Teoria social e meio ambiente**. Lisboa. Piaget, 1996. 312 p.

HESPAHOL, A. N. Agricultura, desenvolvimento e sustentabilidade. In: XVIII Encontro Nacional de Geografia Agrária, 2006, Rio de Janeiro. Anais do XVIII Encontro Nacional de Geografia Agrária. Rio de Janeiro: UERJ, 2006. v. 1. p. 1-26.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: proporção de domicílios com segurança alimentar fica abaixo do resultado de 2004. Brasília, 2020. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/28896-pof-2017-2018-proporcao-de-domicilios-com-seguranca-alimentar-fica-abaixo-do-resultado-de-2004>>. Acesso em: 26 de set. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. (Brasil). Nota pública acerca do posicionamento do Instituto Nacional de Câncer sobre o Projeto de Lei nº 6.299/2002 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//nota-publica-inca-pl-6299-2002-11-de-maio-de-2018.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

INTERGOVERNMENTAL SCIENCE-POLICY PLATFORM ON BIODIVERSITY AND ECOSYSTEM SERVICES – IPBES. **The assessment report of the intergovernmental science-policy platform on biodiversity and ecosystem services on pollinators, pollination and food production**. Bonn, Germany, 2016. 552 p. Disponível em: <https://www.ipbes.net/sites/default/files/downloads/pdf/individual_chapters_pollination_20170305.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

KLEIN, A. M., VAISSIERE, B. E., CANE, J. H., STEFFAN-DEWENTER, I., CUNNINGHAM, S. A., KREMEN, C., & TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B: biological sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

Mapeamento de Abelhas Participativo. (São Paulo). **Projeto colmeia viva**. São Paulo, 2017. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-.tematicas/documentos/camaras-setoriais/mel-e-produtos-das-abelhas/anos-anteriores/mapeamento-de-abelhas-participativo-map-41.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

MICHENER, C.D. The Meliponini. In: **Pot-honey**. New York, NY: Springer, 2013. 654 p.

MOREIRA RM, CARMO MS. Agroecologia na construção do desenvolvimento rural sustentável. **Agricultura em São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 37-56, 2004. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/publicacoes/pdf/asp-2-04-4.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; vanENGELSDORP, D. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters

PIRES, C. S. S.; MAUÉS, M. M. Insect Pollinators, Major Threats and Mitigation Measures. **Neotropical Entomology**, v. 49, p. 469–471, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13744-020-00805-7>>. Acesso em: 10 ago 2021.

PLATAFORMA BRASILEIRA DE BIODIVERSIDADE E SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS – BPBES. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. 1 ed. São Carlos, São Paulo, 2019. 184 p. Disponível em: <<http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

PORTO-GONÇALVES, C. W. Geografia da riqueza, fome e meio ambiente: pequena contribuição crítica ao atual modelo agrário/agrícola de uso dos recursos naturais. **Revista Internacional Interdisciplinar INTERthesis**, v. 1, n. 1, p. 1-55, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.5007/%25x>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J. C.; KREMEN, C.; NEUMANN, P.; SCHWEIGER, O.; KUNIN, W. E. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.01.007>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ROSA, A. S.; TEIXEIRA, J. S. G.; VOLLET-NETO, A.; QUEIROZ, E. P.; BLOCHTEIN, B.; PIRES, C. S. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729–738, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0424-4>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

ROSA, A. S.; TEIXEIRA, J. S. G.; VOLLET-NETO, A.; QUEIROZ, E. P.; BLOCHTEIN, B.; PIRES, C. S. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729–738, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13592-015-0424-4>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

SANCHEZ, Bayo, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees - A risk assessment. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014. Available in: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>>. Accessed on: 10 Aug. 2021.

TADEI, R., DOMINGUES, C. E., MALAQUIAS, J. B., CAMILO, E. V., MALASPINA, O., & SILVA-ZACARIN, E. C. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11,

2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

VASCONCELOS, Y. **Agrotóxicos na berlinda**. Pesquisa FAPESP, São Paulo, v. 271, p. 18-27, 2018. Disponível em: <https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2018/09/018-027_CAPA-Agrot%C3%B3xicos_271-1.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WEZEL, A.; BELLON, S.; DORÉ, T.; FRANCIS, C.; VALLOD, D.; DAVID, C. Agroecology as a science, a movement and a practice. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, p. 503–515, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1051/agro/2009004>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

WOOD, T. J.; GOULSON, D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17285-17325, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>>. Acesso em: 10 ago. 2021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho reforça a importância de considerar os efeitos de diferentes classes de agrotóxicos como riscos potenciais para as espécies de abelhas nativas. Tendo em vista a importância ecológica, econômica e as evidências do declínio destas populações (Gonçalves e Castilhos 2015a, b; Pires et al. 2016; Castilhos et al. 2019). Dentre as abelhas nativas do Brasil, as espécies pertencentes a tribo Meliponini (abelhas-sem-ferrão) representam um grupo diverso de abelhas eusociais, cuja distribuição é neotropical (Michener, 2007) sendo consideradas melhores representantes da biodiversidade brasileira para estudos ecotoxicológicos do que *Apis mellifera* (Tomé et al., 2015; Dorigo et al., 2019; Rosa et al., 2020).

Embora os fungicidas sejam considerados seguros para as abelhas, eles estão entre os agrotóxicos mais detectados em matrizes apícolas e recursos florais (Castilhos et al., 2019; Raimets et al., 2020, Traynor 2021). Diante disso, os resultados desta pesquisa contribuem para iniciar e destacar a importância do desenvolvimento de estudos sobre o efeito destes agrotóxicos para imaturos de abelhas-sem-ferrão. Nossos achados confirmam que os efeitos destes produtos não podem ser desprezados e devem ser reavaliados tendo em vista os efeitos letais e subletais para abelhas do Mancozebe, o fungicida mais consumido e comercializado no Brasil (IBAMA, 2019), e da Piraclostrobina, fungicida encontrado no pólen, néctar, mel, cera no alimento larval e no corpo de abelhas (Pettis et al. 2013; Beyer et al., 2018; Tosi et al., 2018; Ostiguy et al., 2019).

Além da avaliação dos fungicidas isolados, cabe destacar a importância de se realizar testes toxicológicos com estes produtos associados a outras classes de agrotóxicos, ou mesmo com mais de um fungicida junto, uma vez que em condições de campo (agroecossistemas), as abelhas estão expostas a uma diversidade de agrotóxicos e patógenos (Goulson et al., 2015). Neste contexto, esse estudo possibilitou observar como estressores podem atuar em conjunto ao analisarmos as genitálias de machos imaturos de *Scaptotrigona bipunctata*. Estudos toxicológicos com machos de abelhas-sem-ferrão são escassos, especialmente pela dificuldade de criá-los em laboratório, dado que na coleta das larvas de favos de cria de colônias matrizes apenas 10% corresponde , potencialmente, a machos (Velthuis et al., 2005). Por isso, destaca-se o ineditismo e a importância de estudos como

este, a fim de estimular que mais trabalhos sejam desenvolvidos sobre os efeitos de agrotóxicos em machos, posto a importância deles no ciclo reprodutivo da colônia. Ainda quanto a estudos ecotoxicológicos para avaliar efeitos de fungicidas às abelhas, nós sugerimos que sejam conduzidas novas pesquisas considerando (a) a relação mutualística larva-fungo (do alimento larval), com o efeito dos fungicidas na comunidade de fungos e suas consequências para a ontogênese de abelhas-sem-ferrão; (b) o efeito no microbioma intestinal das abelhas expostas a fungicidas, considerando o organismo alvo desses produtos; (c) possíveis efeitos destes produtos em larvas e adultos, com a utilização de biomarcadores celulares; (d) o comportamento de abelhas recém-emergidas após exposição a fungicidas de forma isolada e combinada a outros agrotóxicos; e ainda (e) a necessidade avaliar os efeitos em abelhas da exposição de fungicidas combinados a herbicidas, tomando-se como antecedente achados de resíduos destes agrotóxicos de forma associada em ocorrências de mortandade de abelhas melíferas.

Por último, cabe refletir sobre a realidade da avaliação de risco de agrotóxicos no Brasil, frente ao cenário político-econômico que estamos vivendo. Até 2017, ano em que essa tese iniciou, verificávamos uma política tímida que buscava atender às necessidades de proteção dos polinizadores frente às demandas de regulamentação do uso de novos agrotóxicos, pautando inclusive que fossem inseridos testes toxicológicos utilizando larvas e adultos de abelhas, e considerando agrotóxicos que não têm como organismos-alvos os insetos, a exemplo dos fungicidas. Além da utilização das abelhas-sem-ferrão como modelo representativo da biodiversidade brasileira para avaliações de risco.

Entretanto, desde 2018 e acentuadamente no ano de 2020, observamos uma mudança drástica deste cenário, junto a isso um pico de liberação de uso de agrotóxicos, quando em dois anos (2018-2020), foi aprovado o uso de 1.130 produtos (MAPA, 2020). Desta forma, estamos diante da orquestração do fenômeno da irresponsabilidade organizada no contexto da regulamentação dos agrotóxicos, no que tange os riscos ambientais, e em especial aos organismos não alvo como os polinizadores silvestres, enfocados no presente estudo.

Referências

BEYER, M. et al. Pesticide residue profiles in bee bread and pollen samples and the survival of honeybee colonies—a case study from Luxembourg. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 32, p. 32163–32177, nov. 2018.

CHAM, K. DE O. et al. Manual de Avaliação de Risco Ambiental de Agrotóxicos para Abelhas. Brasília: **IBAMA**, 2017.

CASTILHOS, D., BERGAMO, G.C., GRAMACHO, K.P., GONÇALVES, L.S. Colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, online version. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7>, 2019.

GONÇALVES, L.S e CASTILHOS, D. Application of the electronic device "BEE ALERT" for registering death of honeybees, stingless bees in general and disappearance of honey bees (CCD) in Brazil. In: International Apicultural Congress, 44. Daejeon, Korea. **Scientific Program Abstracts**. Annals of... Daejeon: Apimondia, p. 218, 2015b.

GOULSON, D. et al. Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

TOSI, S. et al. A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides. **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 208–218, fev. 2018

OSTIGUY, N. et al. Honey bee exposure to pesticides: A four-year nationwide study. **Insects**, 2019.

PETTIS, J. S. et al. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen Nosema ceranae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70182, jul. 2013.

RAIMETS, R. et al. Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. **Chemosphere**, v. 238, jan. 2020.

VELTHUIS, H.H.W.; KOEDAM D.; IMPERATRIZ-FONSECA V.L. The males of Melipona and other stingless bees, and their mothers. **Apidologie** 36:169–185. <https://doi.org/10.1051/apido>, 2005.

