



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

MARIA DAS DORES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS EM ABELHAS JATAÍ
(*TETRAGONISCA ANGUSTULA*) EXPOSTAS AOS PESTICIDAS IMIDACLOPRIDO
E CIPERMETRINA E À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA**

RECIFE

2023

MARIA DAS DORES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS EM ABELHAS JATAÍ
(*TETRAGONISCA ANGUSTULA*) EXPOSTAS AOS PESTICIDAS IMIDACLOPRIDO
E CIPERMETRINA E À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Zoologia Aplicada.

Orientadora: Dra. Claudia Rohde

Coorientadora: Dra. Érika Maria de Amorim

RECIFE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Maria das Dores da

Avaliação dos efeitos genotóxicos em abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) expostas aos pesticidas imidacloprido e cipermetrina e à poluição atmosférica / Maria das Dores da Silva – 2023.

68 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Claudia Rohde

Coorientadora: Érika Maria de Amorim

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Recife, 2023.

Inclui referências .

1. Abelhas 2. Polinizadores 3. Toxicologia ambiental I. Rohde, Claudia (orient.) II. Amorim, Érika Maria de (coorient.) III. Título

595.799

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -069

MARIA DAS DORES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS EM ABELHAS JATAÍ
(*TETRAGONISCA ANGUSTULA*) EXPOSTAS AOS PESTICIDAS IMIDACLOPRIDO
E CIPERMETRINA E À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia Animal

Aprovada em: 16/02/2023

Orientadora: Dra. Claudia Rohde

Coorientadora: Dra. Érika Maria de Amorim

BANCA EXAMINADORA
Titulares

Prof. Dr. **Simão Dias de Vasconcelos Filho** – UFPE

Prof. Dr. **Paulo Sérgio Martins de Carvalho** – UFPE

Prof. Dr. **Emerson Peter da Silva Falcão** – UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar pelo caminho do amor, da sabedoria, da honestidade! Sinto sua presença constantemente em minha vida, nos momentos mais difíceis era meu refúgio, onde buscava discernimento e forças para continuar minha caminhada. Obrigada por me capacitar diariamente, me guiar nos meus sonhos, por acreditar que sou capaz e me proporcionar tantas vitórias em meu viver, sou eternamente grata!

Agradeço aos meus pais, Cícero Alves e Isabel Cristina por todo cuidado e amor. Vocês são meu exemplo diário de honestidade e caráter. Sou imensamente grata a minha Mãe, Isabel Cristina por seu amor incondicional, sua dedicação e, principalmente por cuidar do meu bem mais precioso, que são minhas filhas, Sophia França e Esther França, sem seu apoio eu não conseguiria realizar minhas atividades acadêmicas, obrigada por tudo.

Agradeço ao apoio da minha irmã, Rubiana Cristina, pelo seu companheirismo, sua alegria contagiante, seus pensamentos positivos, seu amor e cuidado com minhas filhas, sempre disposta a me ajudar nos meus momentos que mais precisei, suas palavras de motivação foram essenciais para que eu pudesse continuar. Sou eternamente grata a você.

Tenho um agradecimento especial a fazer, que é ao meu marido, Sandro França, por sempre me incentivar a ingressar na vida acadêmica, por seu apoio incondicional, sempre prestativo e amoroso. Obrigada por seus cuidados, sua compreensão por minha ausência em muitos momentos de nossa vida. Seu cuidado e amor com nossas filhas, foram essenciais para que eu pudesse realizar minhas atividades com tranquilidade. Amo vocês incondicionalmente.

A vocês, família, meu eterno agradecimento. Foram vocês que estiveram ao meu lado desde o início da minha caminhada, foram em vocês que eu busquei forças para continuar quando eu pensava em desistir. Sem vocês nada disso faria sentido. Meu eterno agradecimento.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Claudia Rohde, um exemplo de profissional. Eu me sinto honrada em tê-la como mentora todos esses anos, desde a graduação. Ao decorrer desses anos foram lindos momentos compartilhados de descontração, alegrias e muito conhecimento. Minha imensa gratidão!

Agradeço à minha Coorientadora, Dra. Érima Amorim, uma amiga que a vida me presenteou. Sou eternamente grata a você por toda sua ajuda nos experimentos, suas palavras de motivação e persistência me ajudaram muito na minha caminhada. Agradeço a parceria de sempre. Sou imensamente grata a você!

A toda equipe do Laboratório de Genética do Centro Acadêmico de Vitória - UFPE, especialmente ao grupo da Mutagênese, pela boa companhia, momentos de alegrias, descontração, estímulo e assistência nos experimentos.

A Gislane Pereira, por sua amizade e ajuda incondicional nos experimentos. Seus conselhos, suas palavras de motivação, companheirismo, pelos momentos de alegrias que me ajudaram a minimizar o estresse. Não posso esquecer de seus cuidados, incentivo a mim

prestados! Saiba que foram essenciais para que eu pudesse concluir meu projeto. Amo tê-la como minha amiga e saiba que você poderá contar comigo sempre.

Aos meus amigos da graduação, por acreditarem em mim e compartilharem comigo momentos de grande significado: Amanda Celerino, Anderson Monteiro, Ayrton Agripino, Crislaine Maria, Jandson Silva, Janielly Carla, Juscelina Melo, Lizandra Ferraz, Lucas Alcântara, Mirella Karine e Rose Kelly.

Agradeço à minha turma do mestrado, PPGBA 2020.2, por dividirem comigo alegrias e estresses durante os dois anos de curso.

Minha imensa gratidão à Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Biociências, aos docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, ao apoio financeiro da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), e a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco), por me proporcionarem o apoio necessário para que eu pudesse realizar o mestrado.

Ao Centro Acadêmico de Vitória - UFPE, por oferecer subsídios para realização das etapas experimentais da minha pesquisa.

Sou grata ao Sr. Ramos, por ter cedido as abelhas para realização deste estudo.

Enfim, agradeço a todos que indiretamente ou diretamente contribuíram para que eu pudesse concluir todas as etapas desse projeto.

RESUMO

As abelhas sem ferrão são consideradas importantes provedores de serviços ecossistêmicos, como a polinização. No entanto, vários estudos científicos têm reportado o declínio desses polinizadores, levando preocupações ecológicas e econômicas. Dentre as diversas hipóteses para o declínio, o uso indiscriminado de pesticidas e estressores ambientais como a queima de combustíveis fósseis são apontados como contribuintes para este declínio comprometendo aspectos cognitivos e locomotores das abelhas. Assim, objetivou-se com este estudo analisar o efeito genotóxico dos inseticidas imidacloprido e cipermetrina, bem como da poluição urbana, no genoma da abelha nativa *Tetragonisca angustula*, por meio do Ensaio cometa. Para tanto, primeiramente a metodologia do Ensaio cometa foi padronizada para este organismo, o que ocorreu concomitantemente ao estabelecimento dos grupos controle negativo, no qual as abelhas se alimentaram apenas de xarope, e o grupo controle positivo, no qual as abelhas foram alimentadas com ciclofosfamida (2 mg/mL) diluída em xarope. Após a validação do Ensaio cometa, as abelhas foram expostas a diferentes concentrações do inseticida imidacloprido (1,5; 3,0; 6,0; 12,0 e 24,0 ng/mL), diluídos em xarope por 48 h, e de cipermetrina (6,0; 12,0 e 24,0 ng/mL). Foram também estudadas abelhas de colônias naturais do Parque Arraial Bom Jesus na cidade de Recife, Pernambuco, um local urbano com intensa movimentação de veículos e pessoas. Um grupo controle negativo ambiental foi realizado com abelhas oriundas da Área de Proteção Ambiental Aldeia- Beberibe, Pernambuco. Os resultados destes estudos validaram a metodologia do Ensaio cometa em hemócitos de adultos de *T. angustula*. Os resultados obtidos por meio do Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) indicaram maior efeito genotóxico do imidacloprido e da cipermetrina nas maiores concentrações (12 e 24 ng/mL), resultando em elevada ocorrência de lesões de níveis 3 e 4, consideradas as mais agressivas ao material genético. No estudo do efeito genotóxico associado à poluição, houve danos em duas das três colônias de abelhas, demonstrando associação com os poluentes atmosféricos inerentes ao ambiente urbano. Apresentamos evidências de que estressores ambientais, como a poluição urbana e os pesticidas testados, comprometem o genoma das abelhas da espécie *T. angustula*. Portanto, são fatores de risco para a saúde dos polinizadores, para o bem-estar das populações, e contribuem para a redução dos serviços ecossistêmicos oferecidos, que são valiosos para a humanidade.

Palavras-chave: Abelhas nativas; Genotoxicidade; Poluentes ambientais; Polinizadores.

ABSTRACT

Stingless bees are considered important providers of ecosystem services such as pollination. However, several scientific studies have reported pollinator declines, leading to ecological and crippling concerns. Among the various possibilities for decline, the indiscriminate use of pesticides and environmental stressors such as the burning of fossil fuels are identified as contributors to this decline, compromising cognitive and locomotor aspects of bees. Thus, the aim of this study was to analyze the genotoxic effect of the insecticides imidacloprid and cypermethrin, as well as urban fuel, on the genome of the native bee *Tetragonisca angustula*, through the Comet assay. Therefore, the methodology of the Comet assay was standardized for this organism, which occurred concomitantly with the establishment of the negative control groups, in which the bees fed only on syrup, and the positive control group, in which the bees were fed with cyclophosphamide (2 mg/mL) diluted in the syrup. After validation of the Comet assay, the bees were exposed to different concentrations of the insecticide imidacloprid (1.5; 3.0; 6.0; 12.0 and 24.0 ng/mL), diluted in syrup, during 48 h, and to cypermethrin (6.0; 12.0 and 24.0 ng/mL). Bees from natural colonies in the Arraial Bom Jesus Park in the city of Recife, Pernambuco, an urban area with intense movement of vehicles and people were also studied. An environmental negative control group was carried out with bees from the Aldeia-Beberibe Environmental Protection Area, Pernambuco. The results of these studies show the validation of the methodology in hemocytes of *T. angustula* adults. The results obtained through the Damage Index (DI) and Damage Frequency (DF%) indicated a greater genotoxic effect of imidacloprid and cypermethrin at the highest concentrations (12 and 24 ng/mL), resulting in a high occurrence of level 3 and 4, considered the most aggressive lesions to the genetic material. In the study of the genotoxic effect associated with fuel, there was damage in two of the three bee colonies, demonstrating an association with atmospheric pollutants inherent in the urban environment. We present evidence that environmental stressors, such as urban fuel and the pesticides tested, compromise the genome of *T. angustula* bees. Therefore, they are risk factors for the health of pollinators, for the well-being of the tolerant ones, and they worked to reduce the ecosystem services offered, which are valuable to humanity.

Keywords: Native bees; Genotoxicity; Environmental pollutants; Pollinators.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Adultos <i>Tetragonisca angustula</i>	13
Figura 2 –	Estrutura química do neonicotinóide Imidacloprido.....	17
Figura 3 –	Estrutura química do piretróide Cipermetrina.....	18
 ARTIGO 1		
Figura 1 –	Representação do sugador elétrico utilizado para coletar as abelhas adultas <i>Tetragonisca angustula</i> (setas) aderidas à rede no interior do aparelho; e tubo de vidro utilizado para o transporte, após a coleta das abelhas.....	26
Figura 2 –	A. Transferência das abelhas para os potes de plásticos para exposição. B e C. Modelo de pote plástico adaptado para os testes em laboratório.....	27
Figura 3 –	Imagens dos níveis de dano (0 a 4) em hemócitos de adultos de <i>Tetragonisca angustula</i> . Fotos obtidas em microscopia de fluorescência (Zeiss Axion) em aumento de 40x e coloração com GelRed.....	28
 ARTIGO 3		
Figura 1 –	Mapa parcial da cidade do Recife, com indicação da área verde do Parque do Arraial do Bom Jesus, o local aproximado da coleta de adultos de <i>Tetragonisca angustula</i>	50
Figura 2 –	Aspectos das três colônias naturais de abelhas Jataí no Parque urbano do Recife, PE.....	51

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- Tabela 1 –** Valores médios do número de células observadas com níveis de danos 0 a 4, e valores médios calculados para o Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%), em células da hemolinfa de adultos de *T. angustula*, submetidos aos tratamentos controle negativo (CO-) e controle positivo (CO+), e as diferentes concentrações de imidacloprido (IMD)..... 29
- Tabela 2 –** Resultados da análise do pós-teste de Bonferroni para comparações par a par dos valores médios de Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos controle e tratamentos..... 30

ARTIGO 2

- Tabela 1 –** Valores médios do número de células observadas com níveis de danos 0 a 4, e valores médios calculados para o Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%), em células da hemolinfa de adultos de *T. angustula*, submetidos aos tratamentos controle negativo ambiental (CO- A), controle negativo laboratorial (CO-L) e controle positivo (CO+), e a diferentes concentrações da cipermetrina (CYP)..... 40
- Tabela 2 –** Resultados da análise do pós-teste de Bonferroni para comparações par a par dos valores médios de Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos controle e tratamentos..... 42

ARTIGO 3

- Tabela 1 –** Valores médios calculados para cada um dos níveis de dano (0 a 4) e para os valores calculados de Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) observados em hemócitos de adultos de *Tetragonisca angustula*, após coleta no ambiente urbano de Recife, e na Área de Proteção Ambiental Aldeia-Beberibe (controle negativo). Asteriscos indicam valores de ID ou FD% diferentes do grupo controle negativo ($P \leq 0,05$)..... 53
- Tabela 2 –** Análise do pós-teste de Bonferroni para comparações par a par dos valores médios de Índice de Dano (abaixo da diagonal, a esquerda) e Frequência de Dano (acima da diagonal, a direita) entre os grupos..... 54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
2.1 <i>Tetragonisca angustula</i> : aspectos gerais e ecológicos.....	12
2.2 Agrotóxicos e seus impactos.....	15
2.2.1 Pesticidas neonicotícoídes: Imidacloprido.....	16
2.2.2 Pesticidas piretróides: Cipermetrina.....	18
2.3 Poluição urbana e suas implicações.....	19
2.4 Ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade.....	21
3 OBJETIVOS.....	22
4 RESULTADOS.....	23
4.1 ARTIGO I Avaliação da genotoxicidade do neonicotinóide Imidacloprido em abelhas sem ferrão <i>Tetragonisca angustula</i> (Latreille) por meio do Ensaio cometa.....	23
4.2 ARTIGO II Efeito genotóxico do inseticida Cipermetrina em abelhas sem ferrão <i>Tetragonisca angustula</i> (Apidae: Meliponini).....	36
4.3ARTIGO III Efeitos genotóxicos em abelhas sem ferrão <i>Tetragonisca angustula</i> (Apidae: Meliponini) associados à poluição atmosférica urbana.....	48
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

As abelhas apresentam distribuição geográfica em todo o mundo e são conhecidas mais de 20.000 mil espécies (MICHENER, 2013; ASCHER; PICKERING, 2020), que são responsáveis pelo fornecimento de produtos apícolas como o mel, a cera, e o própolis (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2004, SLAA et al., 2006, VOSSLER et al. 2018). No entanto, sua importância vai além disso, pois elas são consideradas os principais agentes polinizadores (SZCZUREK et al., 2020).

De acordo com Williams (2008), as abelhas são responsáveis pela polinização de mais de 90% das plantas com flores, que além de contribuir para os serviços ecossistêmicos, ajudando na produção agrícola e segurança alimentar (POTTS et al., 2016), participam essencialmente da biodiversidade (GODFRAY et al., 2010; TILMAN et al., 2011). Nesse viés, a espécie *Tetragonisca angustula* uma abelha nativa sem ferrão, conhecida popularmente como jataí, vem sendo alvo de muitas pesquisas científicas pela sua eficiência em polinizar plantas selvagens e culturas economicamente valiosas (GIANNINI et al., 2020).

O declínio na diversidade e abundância de polinizadores vêm sendo pauta de muitos estudos e tornou-se motivo de preocupação (CAMERON et al., 2011; DIVELEY et al., 2012) em relação à sustentabilidade dos serviços de polinização. Níveis insatisfatórios desse serviço comprometem a interação planta-polinizador (RIAZ et al., 2020) e a produção agrícola mundial. (ALVAREZ et al., 2017).

Além disso, esses polinizadores sofrem com ações antropogênicas em seu meio, que se intensifica pela liberação imprudente de agrotóxicos (PIRES et al., 2016) desencadeando sérios problemas para as abelhas devido a sua toxicidade. O contaminante lambda- cialotrina, por exemplo, quando administrado em concentrações subletais e ingerido cronicamente causam danos no intestino médio, glândulas hipofaríngeas e cérebro das abelhas (CASTRO et al., 2020). Enquanto outros contaminantes podem ocasionar danos ainda no desenvolvimento das abelhas quando expostas a eles, por exemplo, resíduos de pesticidas em favos de cria como os cipermetrina, imidacloprido e dentre outros causam efeitos subletais no desenvolvimento e longevidade das abelhas operárias (WU, JUDY Y.; ANELLI, CAROL M.; SHEPPARD, 2011).

Outro problema para a saúde das abelhas são os locais com emissões elevadas de compostos químicos, especialmente vindos das indústrias e dos veículos automotores (GUARIEIRO; VASCONCELLOS; SOLCI, 2011). Sendo assim, as abelhas quando expostas

a poluentes ambientais e a agrotóxicos acabam comprometendo vários aspectos comportamentais, como por exemplo, a exposição prolongada a concentrações realistas de campo ao imidacloprido e coumafós, implicam em efeitos adversos na aprendizagem olfativa e formação da memória das abelhas (WILLIAMSON; WRIGHT 2013; TOSI et al., 2016). O que implicará de forma negativa durante o forrageamento (GILL et al., 2012; HENRY et al., 2012; SCHNEIDER et al., 2012 FELTHAM et al., 2014), e quando expostas em áreas agrícolas as abelhas têm seu desempenho e desenvolvimento da colônia afetados, assim como efeitos adversos na reprodução (ALBURAKI et al., 2017) fecundidade, crescimento e desenvolvimento das abelhas (DAI et al., 2010).

Assim, poluentes ambientais podem gerar danos ao DNA dos organismos vivos (BOLOGNESI, 2003; SANTANA et al., 2018), porém estudos voltados para os efeitos genotóxicos no genoma de abelhas nativas sem ferrão são incipientes. Múltiplos testes podem ser usados para avaliar danos genéticos causados por agentes genotóxicos, e o Ensaio Cometa (EC), é um deles. Uma técnica rápida, fácil e eficaz para identificar lesões no material genético (OSTLING e JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988; MØLLER, 2006). Diante disso, foi objetivo desse trabalho avaliar o possível efeito genotóxico no DNA de abelhas *Tetragonisca angustula*, expostas a poluição atmosférica e aos pesticidas imidacloprido e cipermetrina, por meio do Ensaio Cometa.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Tetragonisca angustula*: aspectos gerais e ecológicos

A *Tetragonisca angustula* é uma espécie de abelha nativa sem ferrão, conhecida popularmente como Jataí (**Figura 1**) dentre as nativas ela é a mais abundante ocupando países tropicais e subtropicais que vai desde o sul do México ao sul do Brasil (CASTANHEIRA e CONTEL 2005), assim como vários estados brasileiros. É uma abelha rústica, pequena cerca de 4-5 mm de comprimento (MELO et al., 2012) e de fácil adaptação a ambientes urbanos e rurais. Taxonomicamente, a *T. angustula* pertence à família Apidae, ordem Hymenoptera (TRIPLEHORN e JONNISON, 2004) e tribo meliponini (MICHENER, 2013).

Figura 1. Adultos de *Tetragonisca angustula*.



Fonte: Revista Attalea Agronegócios (2020).

Meliponíneos ou abelhas sem ferrão são insetos sociais, são considerados excepcionais polinizadores, pois prestam serviço ao polinizar plantas nativas e cultivadas (GIANNINI et al., 2020). Com 51 gêneros e 500 espécies a tribo Meliponini é a mais diversa (SLAA et al., 2006; ASHER; PICKERING, 2018, CAMARGO; PEDRO, 2013). As abelhas do gênero *Tetragonisca* são espécies valiosas economicamente para o Brasil, pois são responsáveis pela qualidade de plantações agrícolas importantes para o mercado financeiro (GIANNINI et al., 2020).

Tetragonisca angustula e outras espécies de abelhas não nativas apresentam peculiaridades que as distinguem, como a ausência do ferrão, voos mais curtos e o formato de seu ninho, que são construídos na horizontal, apresentando uma única abertura (VIT et al., 2013), suas asas são diferenciadas com nervuras fracas ou muitas delas são ausentes, os machos e as operárias são semelhantes entre si, em termos de tamanho, enquanto a rainha é diferente dos demais em estatura (MICHENER, 2013).

Além de diferentes aspectos morfológicos e comportamentais, as abelhas nativas apresentam hábitos de nidificação os mais variados, que vai desde a troncos de árvores, paredes (ROUBIK 2006; BROWN; OLIVEIRA 2014), o que as tornam mais vulneráveis as mudanças climáticas (CARVALHO; DEL LAMA 2015; GIANNINI et al., 2015). Por fim, elas apresentam habilidades no manuseio, condução e armazenamento do pólen (KLEIN et al., 2007; PATRÍCIO; ROBERTO, 2014).

Em termos comportamentais, as abelhas são insetos sociais com organização de castas que é realizada com divisões de tarefas dentro da colônia (HAMMEL et al., 2016), que é composta por milhares de indivíduos, dos quais apresenta uma abelha-rainha, o zangão e as operárias, a rainha por sua vez é responsável pela reprodução, o zangão, que é o macho é encarregado pela fertilidade da rainha e a casta operária, são responsáveis pela limpeza, coleta e manutenção da colônia, além de coletar pólen e néctar (FLETCHER et al., 2020). Portanto

ao todo tem-se uma média de 2.000-5.000 abelhas operárias por colônia (ALVAREZ; ZAMUDIO, 2016).

Posto isto, as abelhas *T. angustula* precisam manter a integridade de sua colônia, sendo responsabilidade das abelhas-guardas ou sentinelas. Elas exibem um sofisticado sistema de comunicação química que ajuda tanto no reconhecimento de indivíduos pertencentes ou não a colônia, quanto na divisão de tarefas (VAN ZWEDEN; D'ETTORRE, 2010; LEONHARDT, 2017). Assim, o mel e o própolis são defendidos pelas abelhas guardas que são morfologicamente diferentes das demais abelhas (GRÜTER et al., 2012), abarcando até 6% da força de trabalho total (SEGERS et al., 2015).

Esse reconhecimento se dá pelos hidrocarbonetos não voláteis, que são compostos orgânicos presentes na cutícula do inseto (D'ETTORRE; VAN ZWEDEN, 2010; BLOMQUIST e GINZEL, 2021), e por contatos com as antenas eles conseguem detectar qualquer variação em seu meio (SHARMA et al., 2015). Elas se organizam ao redor de seu ninho, que por sua vez apresenta uma única abertura, a qual elas conseguem interceptar a entrada de indivíduos que não pertencem a colônia e, à medida que envelhecem passam a ficar de pé na entrada do ninho identificando indivíduos que pertencem a colônia por meio das antenas (GRÜTER, 2011; KÄRCHER; RATNIEKS, 2009). Assim, as guardas conseguem manter a integridade da colônia interceptando indivíduos que não sejam companheiros do ninho e que possam usurpar recursos (GRÜTER, 2020), além de evitar a disseminação de doenças para a colônia (CAPPA et al., 2019).

Dessa forma, as abelhas jataí conseguem identificar indivíduos companheiros da colônia e para tal efeito, ocorre a liberação dos feromônios de alarme que são condicionados para defesa do ninho, pensando nisso Jernigan et al. (2018), realizaram um estudo baseado em estímulos incondicionados para examinar a resposta adaptativa de espécie *T. angustula* a nível de colônia. Para isto, estabeleceu uma hipótese de realizar repetidas exposições ao feromônio de alarme em diversos contextos para saber se o teste iria modelar a resposta das abelhas. Ao fim do estudo, foi possível constatar que as abelhas tinham uma resposta diferente as diversas mudanças, ou seja, elas se adaptavam as ameaças ambientais, com intuito de poupar energia caso não fosse uma ameaça a nível de colônia.

Outra característica marcante das abelhas jataí é o sabor peculiar do seu mel que apresenta atributos sensoriais que o diferenciam dos demais méis de outras espécies de abelhas, como por exemplo o da *Apis mellifera* (NORDIN et al., 2018). O mel apresenta uma série de compostos importantes que agrega alto valor no mercado, como proteínas (RAMÓN-

SIERRA et al., 2015), minerais (BILUCA et al., 2016, 2017). Seguindo esse viés, Biluca et al. (2020), examinaram o mel de diferentes espécies de abelhas sem ferrão, dentre elas a *Tetragonisca angustula*, no Estado de Santa Catarina no período de floração. Os autores averiguaram os parâmetros físico-químicos dos méis, entre eles, a acidez e o pH e lhes foi atribuído características antibacteriana e anti-inflamatória.

2.2 Agrotóxicos e seus impactos

Por ser um dos maiores produtores agrícolas, o Brasil é um dos países que mais faz uso de agrotóxicos (MARCELINO et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2020; PAUMGARTTEN, 2020), cujo objetivo é melhorar a produção agrícola, frutos, sementes, bem como para evitar o aparecimento de pragas. O Brasil, por ter uma grande área de plantio, requer uma maior quantidade de defensivos agrícolas (PIGNATI et al., 2017), o que têm aumentado com o passar dos anos (ABATI et al., 2021), desencadeando problemas à saúde humana (RAMOS al., 2021) e ao meio ambiente (MORÓN et al., 2014; ESCUDERO et al., 2016).

A vista disso, é inevitável o contato com esses contaminantes, pois eles estão no ar, solo, água e plantas (BOFFETTA, 2006), afetando polinizadores como as abelhas, devido seu comportamento de forrageamento (POTTS et al., 2010), os seres humanos desencadeando doenças respiratórias e cânceres (RAMOS et al., 2021; BOFFETTA, 2006), principalmente para os trabalhadores que não faz uso dos equipamentos de proteção individual (EPI) (ALI et al., 2018; BERNIERI et al., 2020; GARCÍA-GARCÍA et al., 2016; GODOY et al., 2019; PASIANI et al., 2012), assim como práticas precárias de higiene pessoal (DAMALAS; ELEFTHEROHORINOS, 2011, KHANAL; SINGH, 2016, GODOY et al., 2019).

Apesar das evidências dos efeitos adversos dos agrotóxicos, o uso desses defensivos só faz aumentar com o passar dos anos (ABATI et al., 2021). Isto aumenta as chances de exposição a tais contaminantes, de organismos que sejam ou não alvo deles. Além disso, é sabido que estes químicos podem agir como agentes genotóxicos (BOLOGNESI, 2003; DOCEA et al., 2017; KAPELEKA et al., 2019; PAUMGARTTEN, 2020). Um estudo conduzido por Ramos et al. (2021) com 180 trabalhadores rurais expostos direta e indiretamente a ação de agrotóxicos em três municípios brasileiros, no Estado de Goiás, constatou lesões no DNA, sendo esta condição intimamente associada a fatores como sexo, idade e o não uso dos equipamentos de proteção individual (EPI).

Mesmo as abelhas não sendo organismos alvo desses contaminantes, elas apresentam vulnerabilidades a estes quando expostas, o que pode estar atrelado aos mecanismos de defesa que elas possuem, conforme ocorre a ativação ou inativação de enzimas desintoxicantes. As principais enzimas responsáveis na desintoxicação de xenobióticos são a Citocromo (P450), Carboxilesterases (CCEs) e Glutathione S-transferases (GSTs), relacionadas ao metabolismo de pesticidas e/ou resistência a estes (NEWCOMB et al., 1997; DABORN et al., 2012). Por isso, há uma necessidade de entender detalhes acerca dos efeitos toxicológicos dos pesticidas, no que se refere ao mecanismo de ação deles.

Leite et al. (2022) realizaram um teste em condições laboratoriais em que expuseram a abelha *T. angustula* a três diferentes agrotóxicos, clorpirifós (inseticida), ciflumetofem (acaricida) e Difenconazol (fungicida), com doses recomendadas pelo fabricante, de 100 mL/100 L de água, 40 mL/100L de água e 20 mL/100L de água, respectivamente. Os autores relataram que todos os agrotóxicos nas doses testadas causaram mudanças no comportamento das abelhas. O clorpirifós foi considerado o mais tóxico para as abelhas, em que elas apresentaram tremores, dificuldades de locomoção e paralisia em apenas 15 minutos de exposição, seguindo de morte em apenas três horas após seu contato. O difenoconazol, provocou um desenfreio de bater de asas nas abelhas e o ciflumetofeno estimulou atividades de limpeza, ocasionando agitação no interior da gaiola.

Ainda, foi constatado que os efeitos da exposição crônica ao pesticida clorpirifós em abelhas *Scaptotrigona bipunctata* em sua fase larval comprometeu seu desenvolvimento, que refletiu em massa corporal reduzida, apêndices deformados (antenas e pernas) área das asas limitadas e diminuição drástica dos imaturos (DORNELES et al., 2021). A toxicidade dos pesticidas sobre as abelhas pode ser explicada também em virtude da propriedade lipofílica que alguns possuem, por exemplo o spinosad, que é facilmente absorvido pela cutícula dos insetos alcançando ligeiramente seu ponto alvo (MILHONE et al., 2009; LEITE et al., 2012; PADILHA et al., 2020). Sendo assim, o potencial tóxico dos diferentes tipos de agrotóxicos varia de acordo com a via de exposição, tempo e concentração do produto (PIOVESAN et al., 2020).

2.2.1 Pesticidas neonicotinóides: Imidacloprido

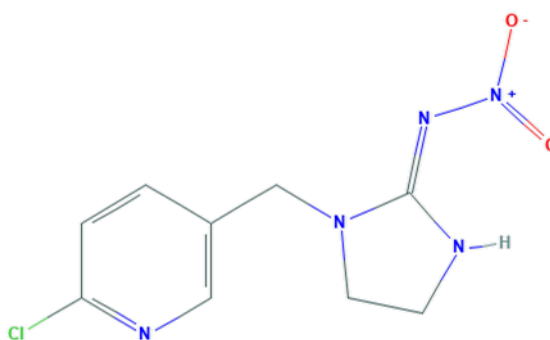
Dentre as classes de pesticidas que mais está relacionada ao declínio das abelhas, estão os neonicotinóides, inseticidas sistêmicos. Estes químicos são assim chamados porque conseguem percorrer toda a planta contaminando o pólen e o néctar, fontes alimentares para as abelhas na fase de floração (JESCHKE; NAUEN, 2008; SIMON-DELSON ET AL., 2010).

2015; WOOD E GOULSON, 2017; BUTLER, 2018). O alvo dos neonicotinóides é o sistema nervoso central, visto que atuam como imitadores de neurotransmissores e ligam-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), causando excitações até paralisia em dose subletais e morte quando se trata de doses letais (JESCHKE e NAUEN, 2008, SIMON-DELSO et al., 2015).

O imidacloprido é o neonocotinóide mais usado e considerado o mais prejudicial as abelhas (BUTLER, 2018). Dessa forma, são os que mais estão documentados na literatura como os principais responsáveis do declínio das abelhas (GOULSON, 2015). Ele se encontra entre os pesticidas que mais gera impactos irreversíveis nas populações de abelhas em todo o mundo, de acordo com uma avaliação realizada pela *European Food Safety Authority* (EFSA). E por serem tóxicos causam sérios danos a memória, olfação, orientação, locomoção, desenvolvimento e coordenação motora (WILLIAMSON e WRIGHT ,2013; CIARLO et al., 2012; GILL et al., 2012).

A toxicidade dos neonicotinóides varia de acordo com seu grupo químico, por exemplo, neonicotinóides com radical ciano são menos tóxicos para as abelhas, enquanto os que apresentam o radical nitro é considerado o mais nocivo as abelhas (JACOB et al., 2019). O imidacloprido, cuja fórmula química está representada na **Figura 2**, contém radical nitro e, portanto, se configura como um inseticida altamente tóxico a saúde destes polinizadores. Este neônico constitui aproximadamente 40% do comércio de neonicotinóides, sendo o produto mais vendido mundialmente e apontando como um dos principais causadores do Distúrbio do Colapso das Colônias (CCD) (PEREIRA; DINIZ; RUVOLO-TAKASUSUKI, 2020).

Figura 2. Estrutura química do neonicotinóide Imidacloprido.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imidacloprid>

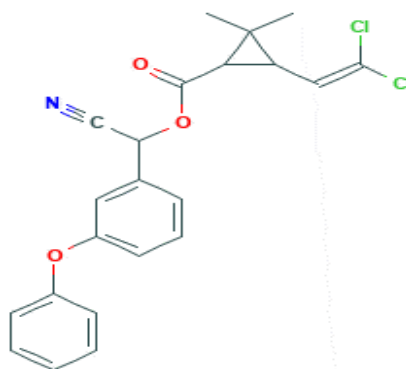
2.2.2 Pesticidas piretróides: *Cipermetrina*

Os piretróides são inseticidas sintéticos que possuem estruturas químicas derivadas das piretrinas e afetam o sistema nervoso de espécies não-alvo provocando paralisia e morte. O enfraquecimento da aplicação de produtos com maior toxicidade pertencentes as classes dos organofosforados e carbamatos promoveu a ascensão de piretrinas e piretróides nos últimos anos, tornando-as uma das classes mais empregadas na agricultura e uso doméstico, constituintes de aproximadamente 3.500 formulações registradas, conforme dados da United States Environmental Protection Agency (2020).

O aumento do uso de piretróides ocorreu principalmente em razão de características convenientes desses compostos, como a rápida eficiência, estabilidade à luz solar, baixo poder de bioacumulação e toxicidade seletiva, geralmente baixa para mamíferos (CASIDA; QUISTAD, 1998, JOHNSON et al., 2006), contudo significativamente alta para peixes e espécies não-alvo de invertebrados (LI et al., 2017). Esta classe representa 25% do mercado de inseticidas mundial e tem sido utilizada há mais de quatro décadas (SHAFER et al., 2005).

Há duas categorias nas quais os piretróides estão agrupados. Aqueles pertencentes ao tipo I provocam agitação e perda de coordenação, enquanto os representantes do tipo II, como a cipermetrina (**Figura 3**), promove a despolarização do nervo e consequente paralisia (SHAFER et al., 2005; LI et al., 2017). Alguns dos modos de ação da cipermetrina envolvem a interrupção do fechamento da porta do canal Na^+ , o que acarreta em uma série de impulsos nervosos que ocasionam a liberação dos neurotransmissores da acetilcolina (ACh) e o estímulo de outros nervos; acúmulo de cálcio no citosol; danos a nível genético e celular, e inibição do receptor GABA, que resulta em espasmos e excitação (ULLAH et al., 2018).

Figura 3. Estrutura química do piretróide Cipermetrina.



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cypermethrin#section=2D-Structure>.

A cipermetrina é um piretróide empregado em larga escala nas culturas agrícolas em decorrência da sua elevada efetividade. Não obstante, a toxicidade deste produto afeta organismos não-alvo e de considerada relevância ambiental, como as abelhas (BHUTIA et al., 2013). Estudos conduzidos por Christen e Fent (2017) e Fent et al. (2020) constataram que a exposição de abelhas a cipermetrina leva a alterações de genes que comprometem a função imunológica. Outros pesticidas da classe dos piretróides, a bifentrina e a lambda-cialotrina, quando usados em doses subletais causam graves danos as abelhas. A bifentrina interfere no estágio larval e fertilidade da rainha (DAI et al., 2010), enquanto a lambda-cialotrina prejudica a capacidade de aprendizagem e memória destes polinizadores (LIAO et al., 2018).

2.3 Poluição urbana e seus efeitos adversos

A poluição ambiental vem se agravando com os passar dos anos e tornou-se um dos problemas mais significativos da atualidade. Essencialmente, a poluição derivada das atividades antrópicas, como atividades industriais e o fluxo de automóveis (GUARIEIRO; VASCONCELLOS; SOLCI, 2011), ocasionando problemas respiratórios que podem impactar negativamente na qualidade de vida das pessoas (HUPFFER; WEYERMÜLLE; ALVES, 2016). Além do mais a exposição a contaminantes podem gerar danos à saúde humana (RAMOS et al., 2021), assim como outros organismos além das abelhas (SANTANA et al., 2017, CESCHI-BERTOLI et al., 2020).

Os poluentes atmosféricos podem ser divididos em primários, os quais são oriundos da ação humana e os secundários que são aqueles resultantes da própria reação desses compostos atmosféricos, que por sua vez podem percorrer longas distâncias (YU et al., 2012; YOUNG et al., 2013; LU; SHEN, 2019; MARTINELLO et al., 2021). Os elementos primários são constituídos por óxidos de nitrogênio (NO_x), compostos orgânicos voláteis (COVs), monóxido de carbono (CO) e dióxido de enxofre (SO₂), por exemplo, enquanto o ozônio (O₃) e o material particulado (MP) compõem os elementos secundários (GUARIEIRO; VASCONCELLOS; SOLCI, 2011).

É sabido que uma das fontes de poluentes são os veículos automotores, que liberam metais pesados e material particulado (PAPA et al., 2021). A deliberação de metais tóxicos na atmosfera provenientes das indústrias e do fluxo veicular, favorece o lançamento de metais como mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e cádmio (Cd), e semi-metais, a exemplo, o arsênico (As), que não são degradados no meio ambiente, eles são persistentes e o papel homeostático não são exercidos por eles, sendo assim qualquer mudança que o ambiente venha a sofrer eles não

vão conseguir manter o ambiente estável (TENKOUANO et al., 2019). Ademais, se acumulam nos tecidos dos animais interferindo nos sistemas nervoso, reprodutivo, imunológico e causam alterações no DNA (TCHOUNWOU et al., 2012; GIZAW et al., 2020).

O material particulado (PM) por definição é considerado uma associação de elementos químicos que são lançados no ambiente e que possuem dimensões distintas (PLUTINO et al., 2022), sendo classificados como PM₁₀ (até 10 µm), PM_{2,5} (até 2,5 µm), PM₁ (até 1 µm) e PM ultrafino (PM 0,1) (MARRON et al., 2013). A fração PM 0,1 é a mais prejudicial, pois permanece por muito mais tempo no ar e uma vez inalada ele consegue chegar aos alvéolos, obstruir as superfícies epiteliais e cair na corrente sanguínea (MAHER et al., 2016, BEMCSLK; LESTAVEL; CANU, 2018, SCHRAUFNAGEL, 2020), comprometendo o funcionamento do cérebro (SCHRAUFNAGEL, 2020). Portanto, PM além de causar lesões no material genético via estresse oxidativo e alterações epigenéticas, refletindo na expressão gênica (DASHTIPOR, 2015; SOLTANI et al., 2017; JAN et al., 2019).

Diante desse cenário, em que a exposição a poluentes atmosféricos desencadeia uma série de implicações negativas ao meio ambiente e a saúde dos organismos que se expõem a eles, faz-se necessário o uso de organismos bioindicadores da qualidade ambiental. Nessa perspectiva, organismos considerados bioindicadores ambientais são importantes para monitorar a qualidade do ar. As abelhas, além de excelentes polinizadores, se destacam por sua atividade como indicadores biológicos das condições ambientais, pois possuem o corpo coberto por pelos e contribuem para o fornecimento de informação acerca de poluentes atmosféricos, tais como metais pesados, MP, pesticidas e outros contaminantes (PORRINI et al., 2003; PERUGINI et al., 2011; SATTA et al., 2012; PORRINI et al., 2016; GIGLIO et al., 2017; GORETTI et al., 2019; MARTINELLO et al., 2021).

Foi observado que poluentes atmosféricos estão relacionados com a redução de insetos polinizadores, uma vez que a interação dos componentes atmosféricos com os compostos orgânicos voláteis das flores podem alterar quimicamente os odores florais (RYALLS et al., 2022) limitando o acesso ao pólen (BENNETT et al., 2020) e comprometendo o ato de forragear dos polinizadores (BLAND et al., 2021). Ainda, pode provocar a interrupção de outros serviços ecossistêmicos mediados por odores como a relação planta-polinizador por afetar ações visuais e olfativas (BLANDE, 2021; RYALLS et al., 2022). Em função de sua atividade de forrageamento, as abelhas estão constantemente expostas e vulneráveis à ação de

poluentes atmosféricos, que acabam se acumulando em seu corpo ou são ingeridos via alimentação (CUNNINGHAM et al., 2022).

2.4 Ensaio cometa para avaliação da genotoxicidade

O Ensaio Cometa, também conhecido como Eletroforese em Gel de Célula Única, é uma técnica rápida, fácil e eficaz para identificar e quantificar lesões no material genético em células individualizadas (OSTLING; JOHANSON, 1984, SINGH et al., 1988; MØLLER, 2005). O ensaio cometa é fundamentado na disposição em que as fitas de DNA tendem a relaxar, permitindo assim que as mesmas se distendam em direção ao ânodo; assim quanto mais quebras, mais os *loops* se distendem e mais visível ficarão os fragmentos que formam a cauda do cometa (COLLINS, 2004; UEDA, 2020). Os cometas são identificados por níveis que vai do 0 (o DNA sem danos) ao nível máximo, o 4 (DNA totalmente danificado) (COLLINS; DIDENKO, 2002).

Além de ser sensível em identificar danos no material genético comparado aos demais testes genotóxicos, o método apresenta vantagens como pequeno quantitativo de células por tratamento, facilidade operacional e rapidez na obtenção dos resultados (TICE et al., 2000). Além disso, pode ser empregado tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo* (GONÇALVES, 2013; LOURO, 2014; KAHL et al., 2015), sendo aplicado em diversos organismos como anfíbios (GONÇALVES et al., 2019), répteis (SILVA, 2015), crustáceos (MOURA et al., 2015), peixes (MATOZO et al., 2015; MOURA et al., 2015), roedores (MENEGUETTI; FACUNDO, 2015; BALDISSERA et al., 2016) e insetos (SANTANA et al., 2018; CESCHI-CESCHI-BERTOLI et al., 2020).

A aplicabilidade da técnica vem sendo aplicada a um número limitado de espécies de insetos comparado à diversidade conhecida atualmente (CESCHI-CESCHI-BERTOLI et al., 2020). Nesta, as células são submetidas a um processo de lise celular, no qual as membranas são rompidas e o conteúdo celular expelido, de modo que, apenas o material genético ocupe todo espaço interno da célula. A molécula é exposta à uma corrente elétrica, com intensidade e tensão específicos, que gera um padrão de migração. O material genético fica concentrado e à medida que os fragmentos de DNA migram em direção ao polo oposto é formada uma cauda semelhante à de um “cometa”. A gravidade da lesão é assim mensurada, pela extensão da cauda e integridade da “cabeça” (MØLLER; AZQUETA; BOUTET-ROBINET, 2020).

3 OBJETIVOS

Geral

Avaliar o potencial efeito genotóxico de doses subletais de pesticidas e da exposição à poluição atmosférica urbana, em abelhas adultas da espécie *Tetragonisca angustula*, por meio do Ensaio cometa.

Específicos

Padronizar a metodologia de coleta e da aplicação do Ensaio cometa em abelhas nativas sem ferrão Jataí com ocorrência em Pernambuco, Brasil, estabelecendo os níveis de danos genéticos de grupos controle;

Caracterizar a possível genotoxicidade de duas classes de pesticidas (Imidacloprido e Cipermetrina) na abelha nativa Jataí;

Investigar o efeito da poluição atmosférica urbana de Recife sobre o genoma das abelhas Jataí, por meio do Ensaio cometa;

Fornecer subsídios para estudos ecotoxicológicos, utilizando abelhas nativas sem ferrão como bioindicadores da qualidade ambiental.

4 RESULTADOS

4.1 Artigo I

Avaliação da genotoxicidade do neonicotinóide Imidacloprido em abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Latreille) por meio do Ensaio cometa

*Assessing the genotoxicity of neonicotinoid Imidacloprid in stingless bees
Tetragonisca angustula (Latreille) by Comet assay*

Maria das Dores da Silva^{a,b}, Erima Maria de Amorim^b, Maria Gislaine Pereira^b, Aleson Aparecido da Silva^b, Samuel Lima de Santana^b, Danubia Guimarães Silva^b e Claudia Rohde^b

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

Nas últimas décadas, as espécies polinizadoras das abelhas (Ordem Hymenoptera) têm sofrido um declínio de suas populações, e fatores antrópicos, tal como uso de pesticidas neonicotinóides, tem sido associado a esse fenômeno. Há evidências que estressores ambientais pode ocasionar alterações no DNA dos organismos, porém, poucos estudos têm sido feitos a este nível genômico em espécies de abelhas, especialmente nas espécies nativas do Brasil, como a abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini). Este estudo buscou padronizar a metodologia do Ensaio cometa e avaliar o potencial efeito genotóxico do neonicotinóide imidacloprido em células da hemolinfa de adultos. Após coleta das abelhas em colmeia artificial junto a uma área de Mata Atlântica presentava (APA Aldeia-Beberibe, Pernambuco, Nordeste do Brasil), as abelhas foram alimentadas por 48 horas com diferentes concentrações do imidacloprido (1,5; 3,0; 6,0; 12,0 e 24,0 ng/mL). Cada tratamento contou com três réplicas, cada uma com 35 adultos, e os danos genéticos foram quantificados pela média do Índice de Dano (ID) e da Frequência de Dano (FD%) entre três réplicas. Os resultados demonstraram efeito genotóxico significativo das três doses mais altas do composto em relação ao grupo controle negativo. Por serem muito susceptíveis ao imidacloprido, este estudo apontou microquebras no DNA nas espécies de abelhas *T. angustula* nas concentrações testadas, especialmente em ambientes agrícolas onde o composto é utilizado, assim novos estudos deverão ser realizados para avaliar riscos em outras espécies de abelhas.

Palavras-chave: Jataí; Pesticidas; Piretróides; Dano genético.

1. INTRODUÇÃO

A classe Insecta é a mais diversa e apresenta elevado número de espécies (5,5 milhões) que habitam os mais variados habitats em todo o mundo (STORK, 2018). Nesta classe, a ordem Hymenoptera agrupa abelhas, formigas e vespas, sendo as abelhas a que desempenham um papel importante na agricultura mundial como polinizadores (POTTS et al., 2016). São conhecidas mais de 20 mil espécies de abelhas (MICHENER, 2013; ASCHER; PICKERING, 2020), das quais 5 mil encontram-se na região neotropical (FREITAS et al. 2009, MOURE et al. 2007) e cerca de 1600 no Brasil (NUNES-SILVA et al., 2020).

Apesar da incontestável relevância das abelhas, em alguns locais do mundo há evidências de que elas estão em declínio, um fenômeno conhecido como *Colony Collapse Disorder* (CCD) que decorre dos efeitos tóxicos e mortais de poluentes presentes cada vez mais nos ambientes (CRESSEY 2013, 2017; GROSS, 2013; EPA, 2022). As abelhas sofrem também com parasitas e patógenos, exposição a pesticidas e menor abundância de alimentos (MULLIN et al., 2010; POTTS et al., 2010, 2016; GOULSON et al., 2015; THEMUDO et al., 2020). Segundo Wright et al. (2018) o estresse nutricional devido à transformação, perda e contaminação do habitat natural está entre os principais fatores que contribuem para o declínio atual das populações de abelhas.

Dentre as espécies de abelhas, destacam-se aquelas que pertencem à tribo Meliponini, conhecidas popularmente como abelhas indígenas “sem ferrão”, por possuírem o ferrão atrofiado (vestigial), sem capacidade de ferroar. Os meliponíneos são abelhas eussociais que constroem colônias perenes, com divisão de castas e trabalho, com sobreposição de gerações. A diversidade dessa tribo é de mais de 500 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Na região neotropical, que é reconhecida como a mais biodiversa, foram registradas 417 espécies de Meliponini (distribuídas em 33 gêneros exclusivos) segundo o catálogo de abelhas neotropicais “Moure” (CAMARGO; PEDRO, 2013; PEDRO, 2014).

O Brasil reúne uma grande diversidade de abelhas nativas (com 80% dos táxons dos Meliponini neotropicais), e tem 409 espécies catalogadas (CAMARGO; PEDRO, 2013). Entretanto, a diversidade ainda é sub amostrada, pois os estudos e levantamentos de espécies tendem a se concentrarem em regiões Sul e Sudeste, e menos nas demais regiões brasileiras. Estudos com abelhas nativas em nosso país são muito bem-vindos, diante da sua importância ecológica e por que muitas espécies de plantas são polinizadas apenas por abelhas sem ferrão (GIANNINI et al., 2020).

Dentre as abelhas nativas destaca-se *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Apidae: Meliponini) conhecida popularmente como Jataí, uma das mais abundantes na região neotropical (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2004, GIANNINI et al., 2020) e uma espécie muito comum que co-habita com populações humanas (VELEZ-RUIZ et al., 2013). Em virtude de sua preferência generalista pela escolha de pólen e pelos serviços de polinização ofertados, é uma espécie extremamente importante para os ecossistemas naturais e agrícolas (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2004, SLAA et al., 2006, VOSSLER et al., 2018, GIANNINI et al., 2020).

Uma das classes de pesticidas mais discutidos neste cenário são os neonicotinóides (CONNOLLY, 2013, CRESSEY, 2017, GODFRAY et al., 2014, LUNDIN et al., 2015, STANLEY et al., 2015; LALONE et al., 2017). São inseticidas sistêmicos que agem no sistema nervoso central como imitadores de neurotransmissores e que ligam-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), causando excitações até a paralisia e morte de insetos, como as abelhas (JESCHKE; NAUEN, 2008, JESCHKE; NAUEN, 2008, JESCHKE et al., 2011; SIMON-DELISO et al., 2015; LALONE et al., 2017).

A literatura traz uma série de estudos voltados para os efeitos adversos do imidacloprido, relacionados a alterações comportamentais, efeitos fisiológicos e cognitivos (WILLIAMSON; WRIGHT, 2013; JACOB et al., 2019; GAO et al., 2020). Todavia, são escassos os estudos voltados para investigação de aspectos genéticos, especialmente o efeito genotóxico associado a este neonicotinóide. Alterações na molécula de DNA podem comprometer diversas funções dos organismos, como a de replicação, transcrição e expressão gênica, contribuindo para perda de funções relevantes do organismos, desenvolvimento de doenças, ou diminuição da diversidade genética (FRIEDBERG, 2003, GIGLIA-MARI, ZOTTER, VERMEULEN, 2011, THEMUDO et al., 2020).

Diante disso, estudos de genotoxicidade são de grande relevância, a fim de saber se a exposição a pesticidas compromete o material genético de organismos e, consequentemente, sua sobrevivência. Considerando o amplo uso do imidacloprido na agricultura e seus diversos efeitos nocivos para a sobrevivência e o funcionamento das colônias de abelhas, este estudo teve como objetivo investigar o potencial genotóxico desse neonicotinóide na abelha nativa sem ferrão *T. Angustula*, aplicando pela primeira vez o Ensaio cometa em adultos da espécie.

2. MATERIAL e MÉTODOS

2.1 Coleta e transporte das abelhas

As abelhas adultas da espécie nativa *Teragonisca angustula* foram coletadas nos meses de setembro e outubro de 2021, junto a uma colônia cultivada em caixa de madeira, em uma área de residência no entorno da Área de Proteção Ambiental Aldeia- Beberibe, (distrito de Aldeia dos Camarás, município de Paudalho, Pernambuco) (coordenadas -7.8). As amostras de *T. angustula* foram obtidas com o auxílio de um Aspirador elétrico (**Figura 1**), sendo os adultos transferidos em tubos de vidros e conduzidos, em seguida, ao Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, para execução do Ensaio cometa.

Figura 1. Representação do sugador elétrico utilizado para coletar as abelhas adultas *Tetragonisca angustula* (setas) aderidas à rede no interior do aparelho; e tubo de vidro utilizado para o transporte, após a coleta.

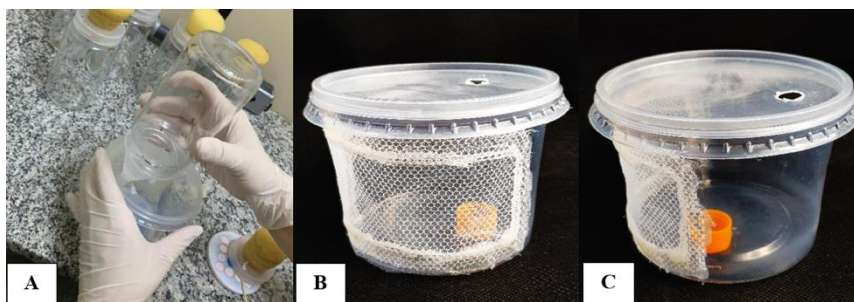


Fonte: Silva (2023).

2.2 Padronização do Ensaio cometa em *T. angustula*

A implementação do Ensaio cometa para *T. angustula* foi feito após vários testes de extração da hemolinfa, priorizando obter a melhor qualidade possível de células, com o menor número de adultos, por cada réplica. Assim, chegou-se ao número de 35 abelhas, que após chegarem no laboratório, foram transferidas para potes de plásticos (500 mL) (**Figura 2**) para serem alimentadas com diferentes doses de imidacloprido. Os potes plásticos foram adaptados para esta finalidade e possuíam na lateral uma tela para permitir a entrada e circulação de ar no recipiente. Por meio de um orifício na tampa, foi adicionada uma solução xarope (composta por uma solução de água destilada e açúcar, na proporção (1:1), usada para alimentar as abelhas.

Figura 2. A. Transferência das abelhas para os potes de plásticos para exposição. B e C. Modelo de pote plástico adaptado para os testes em laboratório.



Fonte: Silva (2023).

Foram testadas cinco concentrações de Imidacloprido (Bayer Evidence, 700 WG - 700 g/kg, 70% m/m) (1,5; 3,0; 6,0; 12,0 e 24,0 ng/mL) misturado ao xarope, e foram também estabelecidos dois grupos controles: um negativo (alimentado apenas com xarope) e um positivo, alimentado com o composto mutagênico Ciclofosfamida a 2 mg/mL (Genuxal-Baxter Hospitalar, São Paulo, SP, Brazil), diluído no xarope. Os organismos se alimentaram por 48 horas em condições controladas, a 27° C em ambiente escuro (exceto durante a reposição do xarope), seguindo trabalhos como: Yasuda et al. (2017), Wong et al. (2018), Jacob et al. (2019), Ceschi-Bertoli et al. (2020). A reposição do xarope foi feita a cada dia, com 3 mL de solução. Os bioensaios foram conduzidos em triplicata (n=35 indivíduos).

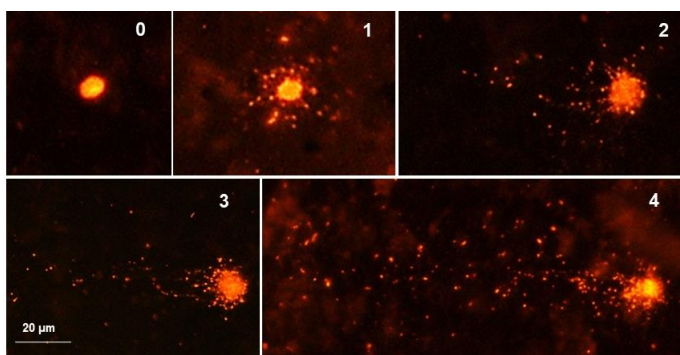
Para obtenção da hemolinfa, as abelhas adultas foram colocadas no refrigerador a 4°C por 1 min para redução da atividade metabólica, facilitando o manuseio. Em seguida foram transferidas para uma placa escavada e com auxílio de uma lupa para a visualização dos adultos, com uma pinça de relojoeiro nº 5 e um bisturi, tiveram a cabeça e o tórax perfurados e pressionados para a obtenção da hemolinfa em solução de EDTA (200 µL) para evitar a coagulação do fluido. Esta e as demais etapas do bioensaio se basearam nas descrições metodológicas de Pereira (2021) para a abelha *Apis mellifera*. Em cada réplica, o material biológico foi coletado de um *pool* celular de 35 indivíduos, misturado e transferido para tubos de microcentrífuga com o auxílio de uma micropipeta, sendo em seguida submetido à centrifugação por duas vezes a 3.000 rpm, por 3 min.

Aproximadamente 60 µL do material foi homogeneizado em 100 µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*, a 0,5%). O material homogeneizado foi espalhado sobre lâminas histológicas, previamente preparadas (lixadas e lavadas) e banhadas em agarose padrão (1,5% de agarose diluída em 100 mL de solução salina tamponada com fosfato - PBS). Sobre o material foi adicionada uma lamínula (24 mm x 60 mm) e as lâminas foram colocadas a 4°C, por 10 min, para solidificação da agarose.

As lamínulas foram removidas e as lâminas contendo o material biológico foram imersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 1% Tris pH 10; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por 48 h, a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram alinhadas em uma cuba de 40 cm, com a superfície fosca virada para cima e voltadas para a direção polo negativo (ânodo), e foi adicionada uma solução de tampão de eletroforese (1 M NaOH; 200 mM EDTA pH>13) para estabilizar, por 20 min. A corrida eletroforética foi feita nas condições: 40 V e 300 mA, por 20 min. Ao término da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e submetidas a uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, depois imersas em etanol absoluto para fixação por 5 min, secas ao ar, e armazenadas em laminário, a 4°C, até o momento da análise microscópica.

Para a observação dos danos em microscopia de fluorescência, as lâminas foram coradas com 50 µL de GelRed (Biotium, Uniscience, São Paulo, Brazil) diluído em água purificada (1:500), e foram observadas em microscópio Zeiss-Imager. M2, equipado com o filtro Alexa-Fluor 546 com aumento de 400X. Os cometas observados foram classificados de acordo com a integridade da cabeça e comprimento da cauda em 5 níveis, de 0 (ausência de dano) até 4 (maior nível de dano), baseado nas imagens descritivas de Silva (2023) (**Figura 3**) para *Tetragonisca angustula*.

Figura 3. Imagens dos níveis de dano (0 a 4) em hemócitos de adultos de *Tetragonisca angustula*. Fotos obtidas em microscopia de fluorescência (Zeiss Axion) em aumento de 400x e coloração com GelRed.



Fonte: Silva (2023).

No total, 100 nucleoides foram observados (50 em cada uma de duas lâminas) para cada réplica, totalizando 300 células analisadas por tratamento. Os níveis de danos observados foram tabulados para o cálculo dos parâmetros do Índice de Dano (ID) e da Frequência de Dano (FD%), de acordo com as fórmulas:

$$ID=0. (\text{n}^\circ \text{ danos } 0) + 1. (\text{n}^\circ \text{ danos } 1) + 2. (\text{n}^\circ \text{ danos } 2) + 3(\text{n}^\circ \text{ danos } 3) + 4. (\text{n}^\circ \text{ danos } 4)$$

$$FD\% = \frac{(\text{n}^\circ \text{ total de danos} - \text{n}^\circ \text{ de danos } 0) \cdot 100}{\text{n}^\circ \text{ total de danos}}$$

A análise estatística foi realizada pela Análise da Variância (ANOVA) e pós-teste de Bonferroni aplicado par a par, no programa STATA 14.0.

3. RESULTADOS

A metodologia do Ensaio cometa foi bem estabelecida em células da hemolinfa de *Tetragonisca angustula*, com material de boa qualidade e em número de nucleóides desejados. Conforme o esperado, os resultados de genotoxicidade observados no grupo controle positivo (Ciclofosfamida a 2 mg/mL) foi alto, com medidas de ID=141,7 e FD% = 50,3. Na **Tabela 1** estão descritos os resultados da exposição a diferentes concentrações do imidacloprido (1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0 ng/mL) e dos grupos controle. Índices e Frequências de Dano altos foram observados nas concentrações de 6,0; 12,0 e 24,0 ng/mL do imidacloprido, em relação ao controle negativo e às doses mais baixas do composto (1,5 e 3,0 ng/mL). A **Tabela 2** apresenta os resultados estatísticos do pós-teste de Bonferroni.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão (Dp) do número de células observadas nos tratamentos controle negativo, controle positivo e concentrações de imidacloprido (IMI), em células de hemolinfa com diferentes graus de dano de adultos da abelha *Tetragonisca angustula*.

Grupos	Dano genético					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
Controle negativo							
Média	88,67	1,67	4,67	3,67	1,33	27,33	11,33
Dp	5,69	1,15	2,52	2,52	0,58	13,43	5,69
Controle positivo							
Média	49,67	9,00	8,00	18,00	15,67	141,67*	50,33
Dp	1,53	1,00	1,73	3,00	2,89	11,02	1,53
IMI – 1,5 ng/mL							
Média	94,00	2,67	1,67	1,67	0	11,00	6,00
Dp	1,00	0,58	0,58	0,58	0	1,73	1,00
IMI – 3,0 ng/mL							
Média	95,67	1,33	0,33	0,67	2,00	12,00	4,33
Dp	1,15	0,58	0,58	1,15	1,73	5,57	1,15
IMI – 6,0 ng/mL							
Média	57,33	9,67	8,33	17,33	7,33	107,67*	42,67*
Dp	4,62	2,52	3,06	1,53	2,52	15,04	4,62
IMI – 12,0 ng/mL							
Média	56,33	7,67	6,33	19,67	10,00	119,33*	43,67*
Dp	1,53	1,15	0,58	1,15	1,00	5,77	1,53
IMI – 24,0 ng/mL							
Média	45,00	9,33	9,67	20,67	14,67	149,33*	55,00*
Dp	1,00	1,53	0,58	2,52	1,53	0,58	1,00

Níveis de dano: zero (0) representa ausência de dano genético; e 1 a 4 indicam níveis crescentes de dano. Asteriscos indicam diferenças significativas entre o grupo controle negativo, e os demais tratamentos ($P \leq 0,05$).

Na Tabela 1 é possível observar que houve uma relação dose-resposta das concentrações de imidacloprido em relação ao grupo controle negativo. Conforme aumenta a dose testada de IMI, aumentam também as lesões ao DNA, até o máximo de ID=149,3 e FD%=55,0) para a maior concentração, 24,0 ng/mL.

Tabela 2. Resultados da análise do pós-teste de Bonferroni para comparações par a par dos valores médios de Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos controle negativo (CO-), controle Positivo (CO+) e tratamentos com imidacloprido (1,5 a 24,0 ng/mL).

Tratamentos	CO-	CO+	1,5 ng/mL	3,0ng/mL	6,0 ng/ml	12,0 ng/ml	24,0 ng/ml
CO-		0,0001*	0,946	0,250	0,0001*	0,0001*	0,0001*
CO+	0,0001*		0,0001*	0,0001*	0,145	0,328	1,000
1,5 ng/mL	1,000	0,0001*		1,000	0,0001*	0,0001*	0,0001*
3,0 ng/mL	1,000	0,0001*	1,000		0,0001*	0,0001*	0,0001*
6,0 ng/ml	0,0001*	0,010*	0,0001*	0,0001*		1,000	0,003*
12,0 ng/ml	0,0001*	0,215	0,0001*	0,0001*	1,000		0,007
24,0 ng/ml	0,0001*	1,000	0,0001*	0,0001*	0,002*	0,029*	

*Diferença significativa ($P \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Foi observado no presente estudo uma relação concentração-resposta de genotoxicidade para o composto comercial imidacloprido, com significativas diferenças de níveis de dano entre as concentrações testadas. Embora o imidacloprido tenha sido altamente genotóxico, nas maiores concentrações, o composto não foi capaz de matar as abelhas. Demonstrando sensibilidade das abelhas ao contaminante.

Seguindo esse panorama Jacob et al. (2019), avaliaram os níveis de sensibilidade de *T. angustula* a quatro inseticidas da classe dos neonocotinóides, o acetamiprido, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam, e os efeitos nas atividades locomotoras das abelhas. Foi constatado que os inseticidas neonicotinóides interferiram negativamente na locomoção, que por sua vez

comprometia a velocidade, distância percorrida, duração e frequência do repouso e mobilidade contínua da espécie tratada oralmente. Outros trabalhos também relatam a alta toxicidade do imidacloprido para as abelhas (JACOB et al., 2019; PETERSON et al., 2020; KIM et al., 2020), corroborando Mommaerts et al. (2010) de que o composto é um produto comercial altamente tóxico.

Resultados similares, indicando efeitos deletérios de outros inseticidas em *T. angustula* foram obtidos por Murcia et al. (2017) que avaliaram a mortalidade dessa espécie e da abelha sem ferrão *Scaptotrigona xanthotricha*, submetidas a diferentes doses de tiametoxam (neonicotinóide) e fipronil (fenilpirazóis), administrados por via oral e por contato. O estudo dos autores evidenciou a elevada susceptibilidade das abelhas aos pesticidas testados, também com efeito dose-resposta. Por outro lado, resultados encontrados por Brito et al. (2020), após exposição ao imidacloprido, não indicaram efeitos genotóxicos ao aplicarem o Ensaio cometa na abelha nativa do Brasil, *Melipona quadrifasciata* (ou Mandaçaia). Da mesma forma, Pereira (2021) também não encontrou danos significativos na espécie *Apis mellifera*, abelha introduzida no Brasil. A autora também aplicou o Ensaio cometa e testou o efeito genotóxico das mesmas concentrações do presente estudo. Os resultados de Brito et al. (2020) e Pereira (2021) indicam que diferentes espécies têm sensibilidade diferentes ou mecanismos mais desenvolvidos para corrigir ou superar os danos genéticos.

Os achados destas pesquisas podem ser também sustentados pelo fato de as abelhas possuírem uma menor quantidade de genes associados a imunidade inata e enzimas desintoxicantes (LARSEN; REYNALDI; NOVOA, 2019). O que vai de encontro com outros estudos na literatura que indicam ocorrência de danos em diferentes organismos, após exposição ao imidacloprido, tal como minhocas (ZANG et al. 2000), anfíbios (FENG et al. 2004, PÉREZ-IGLESIAS et al. 2014), humanos (FENG et al. 2005) e peixes (VIEIRA et al. 2018), todos avaliados pelo Ensaio cometa. Além disso, em teste de genotoxicidade feito com micronúcleo, houve efeitos genotóxicos do imidacloprido em coelhos (STIVAKTAKIS et al. 2016) e em espécies vegetais como *Allium cepa* e *Tradescantia pallida* (RODRÍGUEZ et al. 2015).

Diante do exposto, é preciso complementar os estudos dos aspectos cognitivos, comportamentais, toxicológicos, neurotóxicos causado nas abelhas pela exposição a pesticidas, incluindo também avaliações dos efeitos genotóxicos. Neste sentido, apresentamos a metodologia do Ensaio cometa, ajustada para amostras de adultos de *T. angustula*, que mais

uma vez, se mostrou um bioensaio sensível, rápido e de baixo custo (CHARPENTIER et al., 2014; KATARIA et al., 2016; VERÇOSA et al., 2017; WU et al., 2020; WANG et al., 2016; TOĞAY et al., 2021; SILVA et al., 2023), e que poderia estar presente como metodologia essencial em estudos com abelhas jataí e outras.

5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que o ensaio cometa é uma técnica eficaz para a avaliação de danos genéticos em abelhas. Houve efeito genotóxico do imidacloprido nas condições experimentais testadas, o que enriquece a literatura com informações sobre como o uso de agrotóxicos pode comprometer o genoma de abelhas nativas sem ferrão, uma vez que estudos voltados para essa temática são incipientes.

REFERÊNCIAS

- ASCHER J.S., PICKERING J. **Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila).** Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species> Acesso em 25/01/2023
- AUGUSTYNIAK, M.; GLADYSZ, M.; DZIEWIĘCKA, M. The Comet assay in insects—Status, prospects and benefits for science. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 67-76, 2016.
- BRITO, P.; ELIAS, M.; SILVA-NETO.; et al.. The effects of field-realistic doses of imidacloprid on *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini) workers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 31, p. 38654-38661, 2020.
- CAIRES, S. C.; BARCELOS, D. Colapso das abelhas: Possíveis causas e consequências do seu desaparecimento na natureza. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 11-15, 2017.
- CESCHI-BERTOLI, L.; VIDAL, F.A.P.; BALSAMO, P.J.; ABDALLA, F.C.. Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury. **Chemosphere**, v. 261, p. 127-752, 2020.
- CHARPENTIER, G.; LOUAT, F.; BONMATIN, J. M.; et al.. Lethal and sublethal effects of imidacloprid, after chronic exposure, on the insect model *Drosophila melanogaster*. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 7, p. 4096-4102, 2014.
- COLLINS, A. R.. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.
- CONNOLLY, C.. **Communicative & integrative biology** The risk of insecticides to pollinating insects. , v. 6, n. 5, p. 1634, 2013.
- CRESSEY, D.. The bitter battle over the world's most popular insecticides. **Nature News**, v. 551, n. 7679, p. 156, 2017.
- EPA - U.S. Environmental Protection Agency. Colony Collapse Disorder. Disponível <<https://www.epa.gov/pollinator-protection/colony-collapse-disorder>>. Acesso em 27 jan 2023.

- FENG S, KONG Z.; WANG X.; PENG P.; ZENG, E.Y.. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetics tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 61, n. 2, p.239-246, 2005.
- FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; ZHAO, L.; PENG, P.. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. **Chemosphere**. v. 56, n.5, p. 457-463, 2004.
- FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, C.C.; MEDINA, L.M.; et al.. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v. 40, n. 3, p. 332-346, 2009.
- FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 436-440, 2003.
- GAO, J.; JIN, S.S.; HE, Y.; et al..Physiological Analysis and Transcriptome Analysis of Asian Honey Bee (*Apis cerana cerana*) in Response to Sublethal Neonicotinoid Imidacloprid. **Insects**, v. 11, n. 753, p. 1-20, 2020.
- GIGLIA-MARI, G.; ZOTTER, A.; VERMEULEN, W.. DNA damage response. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. a000745, 2011.
- GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOLÍAS, C.; RATHERAY, E.L.. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.
- JACOB, C. R. O.; ZANARDI, O.Z.; MALAQUIAS, J.B.; et al.. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 224, p. 65-70, 2019.
- JACOB, C. R.; MALAQUIAS, J.B.; ZANARDI, O.Z.; et al.. 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.
- JESCHKE, P.; NAUEN, R. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 11, p. 1084-1098, 2008.
- KATARIA, S. K.; CHHILLAR, A.K.; KUMAR, A.; et al.. Cytogenetic and hematological alterations induced by acute oral exposure of imidacloprid in female mice. **Drug and chemical toxicology**, v. 39, n. 1, p. 59-65, 2016.
- KIM, S.; CHO, S.; LEE, SI .. Synergistic effects of imidacloprid and high temperature on honey bee colonies. **Apidologie**, v. 53, n. 6, p. 1-17, 2022.
- LALONE CA, VILLENEUVE DL, WU-SMART J, MILSK RY, SAPPINGTON K, GARBER KV, et al. Weight of evidence evaluation of a network of adverse outcome pathways linking activation of the nicotinic acetylcholine receptor in honey bees to colony death. **Science of the Total Environment**, v. 584-585, p. 751-775, 2017.
- LARSEN, A.; REYNALDI, F. J.; GUZMÁN-NOVOA, E.. Fundaments of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. **Re Mex Ciênc Pecu**, v. 10, n. 3, p. 705-728, 2019.
- LUNDIN, O.; RUNDLOF, M.; SMITH, H.G; et al.. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. **PLoS one**, v. 10, n. 8, p. 136-928, 2015.
- MALAGODI-BRAGA, K. S.; KLEINERT, A. M. P.. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses? **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n. 7, p. 771-773, 2004.

MICHENER, C. D.. **Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees**, 2013.

MØLLER, P.. The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, n. 4, p. 336-345, 2006.

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

MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.L.; et al.. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e 97-54, 2010.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J..Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PÉREZ-IGLESIAS, J.M.; ARCAUTE, C.R.; NIKOLOFF, N.; et al.. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 104, p. 120-126, 2014.

PETERSON, E. M.; GREEN, F. B.; SMITH, P. N.. Toxic responses of blue orchard mason bees (*Osmia lignaria*) following contact exposure to neonicotinoids, macrocyclic lactones, and pyrethroids. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111-681, 2021.

POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, G.; et al.. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.

POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H.T.; et al..Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220-229, 2016.

QUIROGA-MURCIA, D. E.; ZOTTI, M.J.; POLANÍA, I.Z.; PECH-PECH, E.E.. Toxicity evaluation of two insecticides on *Tetragonisca angustula* and *Scaptotrigona xanthotricha* (Hymenoptera: Apidae). **Agronomía Colombiana**, v. 35, n. 3, p. 340-349, 2017.

RODRÍGUEZ, Y.A.; CHRISTOFOLETTI, C. A. P.; PEDRO, J.; et al.. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438-442, 2015.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZÚMCES, L.P.; et al.. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5-34, 2015.

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

STANLEY, D. A.; GARRATT, M.P.D.; WICHENS, J.B.; et al.. Neonicotinoid pesticide exposure impairs crop pollination services provided by bumblebees. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 548-550, 2015.

STIVAKTAKIS, P.D.; KAVVALAKIS, M.P.; TZATZARAKIS, M.N.; et al.. Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect. **Chemosphere**, v. 149, p. 108-113, 2016.

STORK, N. E.. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth?. **Annual review of entomology**, v. 63, p. 31-45, 2018.

TOĞAY, V. A.; TUREL, G.Y.; ÇELİK, D.A.; et al.. DNA damage effect of cyprodinil and thiacloprid in adult zebrafish gills. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 12, p. 14482-14487, 2021.

VIEIRA, C.E.D.; PÉREZ, M.R.; ACAYABA, R.D.A.; et al.. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 195, p. 125-134, 2018.

VOSSLER, F G.; BLETTLER, D.C.; FAGÜNDEZ, G.A.; DALMAZZO, M.. Stingless bees as potential pollinators in agroecosystems in Argentina: inferences from pot-pollen studies in natural environments. In: **Pot-pollen in stingless bee melittology**. Springer, Cham. p. 155-175, 2018.

WANG, J.; WANG, J.; WANG, G.; et al.. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, v. 144, p. 510-517, 2016.

WONG, M. J.; LIAO, L. H.; BERENBAUM, M. R.. Biphasic concentration-dependent interaction between imidacloprid and dietary phytochemicals in honey bees (*Apis mellifera*). **PloS one**, v. 13, n. 11, p. e 0206625, 2018.

WU, C. H.; LIN, C.L.; WANG, S.E.; LU, C.W.. Effects of imidacloprid, a neonicotinoid insecticide, on the echolocation system of insectivorous bats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 163, p. 94-101, 2020.

YASUDA, M.; SAKAMOTO, Y.; GOKA, K.; et al.. Insecticide susceptibility in Asian honey bees (*Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae)) and implications for wild honey bees in Asia. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 2, p. 447-452, 2017.

ZANG, Y.; ZHONG, Y.; LUO, Y.; KONG, Z.M.. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. **Environmental Pollution**, v. 108, n. 2, p. 271-278, 2000.

4.2 ARTIGO II

Efeito genotóxico do inseticida Cipermetrina em abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini)

Genotoxic effect of Cypermetrin in stingless bees Tetragonisca angustula (Apidae: Meliponini)

Maria das Dores da Silva^{a,b}, Érima Maria de Amorim^b, Maria Gislaine Pereira^b, Aleson Aparecido da Silva^b, Danubia Guimarães Silva^b, Tyago Henrique Alves Saraiva Cipriano^b, Lizandra Ferraz da Silva^b, Claudia Rohde^b.

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

As abelhas sem ferrão são importantes agentes de polinização e, igualmente, possuem importância socioeconômica. Contudo, o uso indiscriminado de agrotóxicos tem implicado para seu desaparecimento, principalmente os relacionados a classe dos piretróides, dentre eles a cipermetrina (CYP), um inseticida sistêmico que afeta o sistema nervoso central dos insetos, desencadeando sérios efeitos adversos. Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial efeito genotóxico da cipermetrina em abelhas *Tetragonisca angustula*, por meio do Ensaio cometa. Para isso, as abelhas foram coletadas no entorno de uma residência em uma mata preservada situada no distrito Aldeia dos Camarás, município de Paudalho, Pernambuco. Os ensaios foram conduzidos no laboratório de genética do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão na Universidade Federal de Pernambuco. O inseticida testado foi a cipermetrina. Os tratamentos realizados foram o grupo controle negativo ambiental (CO-A), composto por abelhas processadas logo quando chegaram ao laboratório; um grupo controle negativo laboratorial (CO-L), que consumiu por 48 h uma mistura de água e açúcar (xarope) com DMSO a 0,01% (solvente); um grupo controle positivo, formado por adultos alimentados com o composto genotóxico Ciclofosfamida (2 mg/mL), diluído no xarope. As concentrações testadas da CYP foram (6,0; 12,0 e 24,0 ng/mL) diluídas em DMSO a 0,01% e xarope, a qual as abelhas foram alimentadas durante 48 h. Cada tratamento contou com três réplicas de 35 adultos cada e o teste ocorreu em triplicata. Os danos genéticos foram quantificados pelo Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%). Os resultados indicaram que, nas condições experimentais deste estudo, a CYP foi genotóxica nas concentrações mais altas (12 e 24,0 ng/mL), revelando uma relação dose-resposta, indicativa de que em doses não letais, quanto maior a dose de CYP, maior será o dano no genoma de *T. angustula*.

Palavras-chave: Ensaio cometa; Genotoxicidade; Jataí; Polinizadores.

1. INTRODUÇÃO

O papel dos polinizadores, especialmente, as abelhas como provedoras dos serviços ecossistêmicos são essenciais para a interação cultura-polinizador (GIANNINI et al., 2020), produção agrícola, economia e bem-estar humano (KLEIN et al., 2007). *Tetragonisca angustula* é uma espécie nativa sem ferrão conhecida popularmente como “jatai” uma das espécies mais abundantes da região neotropical (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2004). Dela provém produtos apícolas como a cera, o própolis e o mel (MALAGODI-BRAGA; KLEINERT, 2004, SLAA et al., 2006, VOSSLER et al., 2018), que se destaca por seu sabor e qualidade peculiar (BILUCA et al., 2020).

Apesar da incontestável relevância, as abelhas vêm sofrendo um extenso e contínuo declínio em diversas partes do mundo, fenômeno que ficou conhecido como Síndrome do Colapso das Colônias (*Colony Collapse Disorder* - CCD) (CRESSEY 2013, 2017; GROSS, 2013; PEREIRA et al., 2020; THEMUDO et al., 2020), o qual é relacionado a uma série de fatores como parasitas, doenças (FRIES, 2010, ROSENKRANZ et al., 2010) introdução de espécies exóticas, ações antropogênicas, que envolve o uso demasiado de agrotóxicos, refletindo negativamente na abundância e diversidade destes polinizadores (POTTS et al., 2010) e, por consequência, afetam os serviços de polinização.

No Brasil, o setor agrícola é uma das atividades mais importantes e relevantes do ponto de vista financeiro. Em consequência disto, o uso de agrotóxicos para a eliminação de pragas é intenso (ALVAREZ et al., 2017), o que traz muita preocupação, pois os produtos químicos agrícolas tem sido apontado como um dos principais impulsionadores do declínio de agentes polinizadores (BRITTAİN et al. 2010; HENRY et al., 2012; MULLIN et al., 2010; WHITEHORN et al., 2012; CASTILHOS et al., 2019) e também da perda da vegetação natural (WINFREE et al., 2009).

Dentre os pesticidas mais usados encontra-se a cipermetrina (CYP), pertencente a classe dos piretróides (CLARK et al., 2015; SETHI et al., 2015). Empregada em larga escala nas culturas agrícolas, sua toxicidade não afeta apenas os insetos considerados pragas, mas também organismos não-alvo e de relevância ambiental, como as abelhas (BHUTIA et al., 2013). Nestes polinizadores, o pesticida é capaz de comprometer ações bioquímicas (MOKKAPATI et al., 2022), que por sua vez vão interferir em suas funções fisiológicas, (BENDAHO; BOUNIAS; FLECHE, 1999, CHIBEE et al., 2021), imunológicas

(CHRISTEN; FENT, 2017, FENT; SCHMID; FENT, 2020), motoras (MAZI et al., 2020; PEREIRA et al., 2021) e comportamentais do organismo (BOFF et al., 2018).

A evidente preocupação dos estudos nos últimos anos é compreender como a sobrevivência das abelhas pode ser afetada pela exposição a pesticidas. Grande parte das investigações permeiam aspectos fisiológicos, cognitivos e comportamentais, porém são escassos os que avaliam a genotoxicidade, especificamente relacionada a CYP. Posto isto, foi objetivo desse estudo avaliar os efeitos genotóxicos da cipermetrina em abelhas nativas sem ferrão *Tetragonisca angustula*, por meio do Ensaio cometa, um bioensaio relativamente rápido e eficaz empregado para a avaliação de danos genéticos no DNA de organismos (CESCHI-BERTOLI et al., 2020).

2. MATERIAIS e MÉTODOS

2.1 Coleta e manejo das abelhas

As abelhas adultas da espécie nativa *Tetragonisca angustula* foram cultivadas em uma residência no entorno de uma mata preservada situada no distrito Aldeia dos Camarás, município de Paudalho, Pernambuco (coordenadas -7.8980531573898025, -35.068044282941656). Para execução do bioensio, uma amostra foi coletada com auxílio de um aspirador elétrico, em outubro de 2022. Após a coleta, as abelhas foram transferidas para potes de vidros que foram fechados com rolhas a fim de permitir a entrada de ar e garantir a chegada dos organismos no Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco.

2.2 Exposição aguda das abelhas a Cipermetrina (CYP) por via oral

Em laboratório, os adultos foram transferidos para potes plásticos (**Figura 1**), sendo uma amostra processada de imediato para análise do material, compondo o grupo controle negativo ambiental (CO-A). O grupo controle positivo (CO+) foi tratado com o composto mutagênico Ciclofosfamida (2 mg/mL), diluído no xarope. O grupo controle negativo laboratorial (CO-L) foi alimentado por 48 h com solução de xarope (água destilada e açúcar 1:1) e DMSO a 0,01% (solvente da Cipermetrina). Os recipientes plásticos de 500 mL continham uma lateral telada, para permitir a circulação de ar, e foram mantidos a 28°C em ambiente escuro (exceto no momento de reposição do alimento), seguindo as descrições prévias de Yasuda et al. (2017), Wong et al. (2018), Jacob et al. (2019), Ceschi-Bertoli et al. (2020), Chibee et al. (2021).

Nas mesmas condições laboratoriais as abelhas foram expostas a três diferentes concentrações da CYP, sendo elas 6,0; 12,0 e 24,0 ng/mL que foram preparadas e diluídas em xarope e DMSO (0,01%).

2.3 Avaliação da genotoxicidade por meio do Ensaio cometa

Para obtenção da hemolinfa, as abelhas adultas foram colocadas no refrigerador a 4° C por 1 minuto para redução da atividade metabólica, facilitando o manuseio. Em seguida foram transferidas para uma placa escavada e com auxílio de uma lupa para a visualização dos adultos, com uma pinça de relojoeiro nº 5 e um bisturi, tiveram a cabeça e o tórax perfurados e pressionados para a obtenção da hemolinfa em solução de EDTA (200 µL), substância usada para evitar a coagulação do fluido. O material biológico foi coletado constituindo um *pool* celular de 35 indivíduos por réplica e transferido com o auxílio de uma micropipeta para tubos de microcentrífuga e submetidos à centrifugação por duas vezes a 3.000 rpm por 3 minutos.

Um total de 60 µL do material centrifugado foi homogeneizado em 100 µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*) (0,5%). Por se tratar de uma etapa fotossensível, este procedimento foi realizado na ausência de luz. O material homogeneizado foi colocado sobre lâminas histológicas, previamente preparadas (lixadas na face superior; lavadas com água e detergente e álcool a 70%; banhadas em agarose padrão 1,5%), e cobertas com lamínulas (24 mm x 60 mm). Após 10 min a 4°C (para solidificação da agarose) as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 1% Tris pH 10; 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por 48 h, a 4°C. Após esse período, as lâminas foram removidas da solução de lise e alinhadas em uma cuba de 40 cm, que foi preenchida com uma solução tampão para eletroforese (1 M NaOH; 200 mM EDTA pH>13) para estabilização do material por 20 min a 4°C. Na sequência, foram submetidas a uma corrida eletroforética a 40 V e 300 mA, por 20 min e, posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, fixadas em etanol absoluto por 5 min, secas ao ar e armazenadas a 4°C até o momento da análise. Os nucleoides foram avaliados em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager. M2), equipado com o filtro Alexa-Fluor 546 com aumento de 400x. O material genético foi corado com 50 µL de GelRed™, diluído em água purificada (1:500).

Os cometas observados ao microscópio foram classificados de acordo com a integridade da cabeça e comprimento da cauda, atribuindo-se valores de 0 (ausência de dano) até 4 (dano máximo). Foram observadas 100 células (50 em cada uma das duas lâminas

analisadas) para cada réplica, totalizando 300 nucleóides avaliados por tratamento. A partir dos níveis de dano observados foram calculados os valores do Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%), de acordo com as fórmulas a seguir:

$$ID = 0. (\text{n}^\circ \text{ danos } 0) + 1. (\text{n}^\circ \text{ danos } 1) + 2. (\text{n}^\circ \text{ danos } 2) + 3(\text{n}^\circ \text{ danos } 3) + 4. (\text{n}^\circ \text{ danos } 4)$$

$$FD\% = \frac{(\text{n}^\circ \text{ total de danos} - \text{n}^\circ \text{ de danos } 0). 100}{\text{n}^\circ \text{ total de danos}}$$

A análise estatística dos valores médios de ID e FD% foi realizada pelo teste de Análise da Variância (ANOVA) entre todos os tratamentos, e pelo pós-teste de Bonferroni, para a par, no programa STATA 14.2. O nível de significância foi $P \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos a partir da exposição de adultos *Tetragonisca angustula* submetidos a diferentes concentrações da Cipermetrina (6.0, 12.0, 24.0 ng/mL), juntamente com os controles (CO-A; CO-L e o CO+) estão apresentados na **Tabela 1**. Os dados mostram o número médio observado de nucleóides com danos de nível 0 a 4, os valores médios calculados de Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%), de cada tratamento. É possível observar no grupo controle positivo a ocorrência de danos de todos os níveis, sobretudo, das classes 3 e 4, que resultaram em medidas altas de ID=141,67 e FD%=50,33.

Tabela 1. Valores médios do número de células observadas com níveis de danos 0 a 4, e valores médios calculados para o Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%), em células da hemolinfa de adultos de *T. angustula*, submetidos aos tratamentos controle negativo ambiental (CO- A), controle negativo laboratorial (CO-L) e controle positivo (CO+), e a diferentes concentrações da cipermetrina (CYP).

Grupos	Danos genéticos					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
CO+							
Média	49,67	9,00	8,00	18,00	15,67	141,67	50,33
Desvio Padrão	1,53	1,00	1,73	3,00	2,89	11,02	1,53
CO- A							
Média	50,67	8,33	12,33	13,67	15,00	134,00	49,33
Desvio Padrão	3,51	1,15	2,52	1,53	3,46	15,72	3,51
CO- L							
Média	50,67	12,00	20,00	7,67	9,67	103,67	49,33
Desvio Padrão	5,13	1,00	2,65	2,31	1,53	0,79	5,13
CYP - 6,0 ng/mL							
Média	46,33	12,67	19,33	2,33	9,33	125,67	53,67
Desvio Padrão	5,86	3,06	1,53	1,15	4,16	18,15	5,86
CYP - 12,0 ng/mL							
Média	33,00	5,67	8,67	22,67	30,00	211,00	67,00
Desvio Padrão	6,00	2,89	0,58	8,50	2,65	33,78	10,54
CYP - 24,00 ng/mL							
Média	13,67	10,00	12,67	24,67	39,00	265,33	86,33
Desvio Padrão	2,52	3,00	2,31	1,53	3,00	14,01	2,52

O resultado envolvendo os controles negativo, ambiental e laboratorial, que apresentaram média nos níveis de danos com valores próximos, em que os valores de ID e FD% não apresentaram diferença significativa quando comparados estatisticamente, assim como quando comparados com o grupo controle positivo (CO+). No entanto, é possível observar uma redução do ID em relação ao grupo controle negativo laboratorial, mas não foi significativa. Diante disso, presume-se então que o local em que as abelhas foram coletadas possui algum estressor que ocasionou tais danos. Logo, em um cenário diferente, com condições controladas de temperatura, luminosidade, alimentação e redução de estresse, as abelhas por vias de reparo exibiu uma redução dos danos genéticos como indica os dados obtidos pelo (CO- L).

As abelhas expostas as concentrações (6.0, 12.0, 24.0 ng/mL), exibiram uma relação concentração-resposta, em que foi observado um aumento de danos genéticos em decorrência ao aumento da concentração, sendo a 24,0 ng/mL foi a que mais ocasionou lesões ao DNA da abelha. Conforme os resultados obtidos a CYP foi genotóxica apenas nas concentrações 12,0 e 24,0 ng/mL, uma vez que diferiram estatisticamente dos controles negativos. Não foi observado diferença significativa entre as concentrações de 12,0 e 24,0 ng/mL, no entanto, ambas diferiram da concentração de 6,0 ng/mL, que não foi genotóxica. A **Tabela 2**, apresenta a análise estatística par a par dos valores médios de Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) (pós-teste de Bonferroni).

Tabela 2. Resultados da análise do pós-teste de Bonferroni para comparações par a par dos valores médios de Índice de Dano (abaixo da diagonal) e Frequência de Dano (acima da diagonal) entre os grupos controle e tratamentos.

Grupos	CO+	CO-A	CO-L	6,0 ng/ml	12,0 ng/ml	24,0 ng/ml
CO+		1,000	1,000	1,000	0,054*	0,0001*
CO-A	1,000		1,000	1,000	0,037*	0,0001*
CO-L	1,000	1,000		1,000	0,037*	0,0001*
6,0 ng/ml	1,000	1,000	1,000		0,207	0,0001*
12,0 ng/ml	0,011*	0,005*	0,0001*	0,002*		0,19
24,0 ng/ml	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,0001*	0,064	

*Diferença significativa ($P \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da exposição a diferentes concentrações da cipermetrina (CYP), indicam que os grupos controle negativo ambiental (CO-A) e o grupo controle negativo laboratorial (CO-L) não diferiram estatisticamente do CO+, assim como do grupo tratado com a concentração 6,0 ng/mL. No entanto, o potencial genotóxico do piretróide foi revelado nas duas maiores concentrações, de 12,0 ng/mL e 24,0 ng/mL, de acordo com os parâmetros de ID e FD% analisados.

Os dados da amostra coletada e processada imediatamente (CO-A) indicam uma ocorrência maior de danos em comparação com o grupo CO-L que, mantidos em laboratório, em condições controladas de temperatura, luminosidade e com uma dieta a base de xarope, apresentaram uma redução no nível de danos. Testes em laboratório exigem controle de fatores que são primordiais para o êxito nos resultados tais como a temperatura, pois é preciso que o ambiente esteja em uma faixa compatível com a temperatura do organismo em seu habitat natural. Uma vez que a temperatura pode comprometer o desenvolvimento e comportamento do organismo, ela é uma peça chave para testes em laboratório (MEDRZYCKI et al., 2013; CHIBEE et al., 2021).

Outro fator relevante e associado aos danos no DNA do grupo CO-A é a dieta, pois o ato de forragear, proporciona as abelhas o contato com uma série de contaminantes que

podem estar contidos em suas fontes alimentares, especialmente, pólen e néctar (TOSI et al., 2017; ZAFEIRAKI et al., 2022). Posto isto, Pettis et al. (2013) realizaram um estudo com abelhas melíferas em diferentes colmeias existentes em diversas safras e identificaram uma gama de pesticidas nas amostras presentes no pólen retido nas abelhas. Ainda, diversos pesticidas pertencentes as classes neonicotinóide e piretróide, e metais pesados, foram encontradas em 45 amostras de pólen coletados em abelhas em um estudo realizado por Zafeiraki et al. (2022).

No que diz respeito a exposição ao pesticida, os danos causados pela cipermetrina aumentaram concomitante a elevação da concentração, no entanto apenas as duas maiores concentrações testadas foram genotóxicas para as abelhas. Este efeito concentração-resposta da CYP foi observado em um outro estudo, conduzido por Mazi et al. (2020), cujo objetivo foi determinar a toxicidade do acetamiprido e da cipermetrina. Notou-se uma progressão da mortalidade à medida que a concentração aumentava e, em 4 horas de exposição, por mecanismo indireto, matou 100% das abelhas da espécie *Apis mellifera* para a concentração de 113,4 ng/μL do acetamiprido e 51,52 ng/μL da cipermetrina, que manifestou elevada toxicidade.

O efeito genotóxico encontrado nas concentrações maiores da cipermetrina em *T. angustula* reforça algumas instabilidades atreladas ao potencial de desintoxicação desses himenópteros. Em 2006, o sequenciamento do genoma da *Apis mellifera*, espécie amplamente usada como modelo em testes de toxicidade em abelhas, revelou uma quantidade reduzida de genes associados ao sistema de defesa e codificantes de enzimas de desintoxicação quando comparada a outros insetos como os do gênero *Drosophila*, por exemplo (LARSEN; REYNALDI; NOVOA, 2019). Por outro lado, é possível também considerar que uma supersaturação da maquinaria de reparo do DNA poderia ocasionar os danos genéticos, visto que o aumento das atividades de reparo favorece simultaneamente a ocorrência de erros (VILLAR; OJEDA, 2019).

Na literatura, é perceptível uma maior concentração de pesquisas relacionadas aos aspectos comportamentais, bioquímicos e fisiológicos das abelhas. Pereira et al. (2021) realizaram um estudo com a espécie de abelha sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata*, que foi exposta a cipermetrina (ingrediente ativo) por via oral (nas concentrações 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 μg/mL) e por contato (concentrações 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 e 1mg/mL). Para ingestão, o inseticida foi colocado no xarope, e por contato, foi adicionado 1 mL e espalhado sobre papel filtro. Com isso foi possível observar o efeito da cipermetrina a nível individual e de colônia,

a longo e curto prazo por 72 h. Porém, após 25 h de exposição foi observado mudanças na motricidade das abelhas tais como tremores e dificuldade na hora do voo. Diante disto, os autores inferiram que este piretróide pode atuar como agente tóxico, comprometendo a sobrevivência das abelhas.

Ainda nesse cenário, Mokkapati et al. (2022) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar alterações fisiológicas e bioquímicas em fêmeas adultas de abelhas *Osmia bicornis* após a exposição oral e continua a três agroquímicos a base de inseticidas, organofosforado (Clorpirifos), piretróide (cipermetrina) e o neonicotinóide (acetamiprido). Após a exposição, foi possível observar alterações nas funções fisiológicas das abelhas por afetar o balanço energético causado pela privação de energia derivada de lipídios e carboidratos, ocasionado redução na taxa respiratória e metabólica das abelhas. No entanto, não interferiu na atividade enzimática da AChE e GST, que por sua vez são primordiais para propagação do impulso nervoso e desintoxicação de agentes tóxicos, respectivamente.

No que tange a genotoxicidade, são poucos os estudos que se empenham a avaliar as lesões genéticas causadas por agroquímicos em espécies de abelhas, sobretudo, as nativas. Contudo, o efeito genotóxico da CYP foi estudado e revelado por meio do Ensaio cometa em insetos como *Drosophila melanogaster* (MUKHOPADHYAY et al., 2004), e outros organismos, como peixes (PARAVANI et al., 2019), ratos (SANKAR et al., 2010), minhocas (MUANGPHRA; SENGSAI; GOONERATNE, 2013) e linfócitos humanos cultivados *in vitro* (KALYAN; RAMBABU; PHILIP, 2007). Para integrar esta lista de trabalhos, a investigação realizada através deste estudo, atesta a genotoxicidade deste piretróide também na abelha nativa sem ferrão *T. angustula*.

5. CONCLUSÃO

Este estudo traz dados valiosos sobre os efeitos genotóxicos da CYP em abelhas *Tetragonisca angustula*. Além de comprovar o efeito genotóxico da CYP, ele enriquece a literatura com informações sobre a genotoxicidade no genoma de abelhas nativas sem ferrão expostas a CYP, uma vez que estudos voltados para essa temática são escassos. À vista disso, trabalhos envolvendo outros aspectos devem ser desenvolvidos para tentar entender os efeitos subletais dos agrotóxicos nas abelhas, com o intuito de mitigar seus impactos na sobrevivência e desempenho desses polinizadores.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, A.; SAEZ, J.M.; COSTA, J.S.D.; et al.. Actinobacteria: current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. **Chemosphere**, v. 166, p. 41-62, 2017.
- BENDAHO, N.; BOUNIAS, M.; FLECHE, C.. Toxicity of cypermethrin and fenitrothion on the hemolymph carbohydrates, head acetylcholinesterase, and thoracic muscle Na⁺, K⁺-ATPase of emerging honeybees (*Apis mellifera mellifera*. L). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 44, n. 2, p. 139-146, 1999.
- BILUCA, F. C.; SILVA, B.; CAON, T.; et al.. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). **Food Research International**, v. 129, p. 108-756, 2020.
- BOFF, S.; FRIEDEL, A.; MUSSURY, R.M.; et al.. Changes in social behavior are induced by pesticide ingestion in a Neotropical stingless bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 164, p. 548-553, 2018.
- BRITTAIN, C.A.; VIGHI, M.; BOMMARCO, R.; et al.. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. **Basic and Applied Ecology**, v. 11, n. 2, p. 106-115, 2010.
- CESCHI-BERTOLI, L.; VIDAL, F.A.P.; BALSAMO, P.J.; ABDALLA, F.C.. Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury. **Chemosphere**, v. 261, p. 127-752, 2020.
- CHIBEE, G.U.; OJELABI, O.M.; FAJANA, H.O.; et al.. Effects of cypermethrin as a model chemical on life cycle and biochemical responses of the tropical stingless bee *Meliponula bocandei* Spinola, 1853. **Environmental Advances**, v. 5, p. 100074, 2021.
- CHRISTEN, V.; FENT, K.. Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 48-59, 2017.
- CRESSEY, D.. Europe debates risk to bees. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 408, 2013.
- CRESSEY, D.. The bitter battle over the world's most popular insecticides. **Nature**, v. 551, n. 7679, 2017.
- FENT, K.; SCHMID, M.; CHRISTEN, V.. Global transcriptome analysis reveals relevant effects at environmental concentrations of cypermethrin in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Pollution**, v. 259, p. 113-715, 2020.
- FRIES, I.. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of invertebrate pathology**, v. 103, p. S73-S79, 2010.
- GIANNINI, T.C.; ALVES, D.A.; ALVES, R.; et al.. Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. **Apidologie**, v. 51, n. 3, p. 406-421, 2020.
- JACOB, C. R. O.; ZANARDI, O.Z.; MALAQUIAS, J.B.; et al.. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 224, p. 65-70, 2019.
- KALYAN, C.B.; RAMBABU, N.; PHILLIP, G.H.. Study of cypermethrin cytogenesis effects on human lymphocytes using in-vitro techniques. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 11, n. 2, 2007.

- KLEIN, A.M.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; et al.. 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.
- LARSEN, A.; REYNALDI, F. J.; GUZMÁN-NOVOA, E.. Fundaments of the honey bee (*Apis mellifera*) immune system. Review. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 10, n. 3, p. 705-728, 2019.
- MALAGODI-BRAGA, K. S.; KLEINERT, A. M. P.. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses? **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n. 7, p. 771-773, 2004.
- MAZI, S.; VROUMSIA, T.; YAHANGAR, M.N.; et al.. Determination of acute lethal doses of acetamiprid and cypermethrin for the Native Bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Cameroon. **Open Journal of Ecology**, v. 10, n. 7, p. 404-417, 2020.
- MEDRZYCKI, P.; GIFFARD, H.; AUPINEL, P.; et al.. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, p. 1-60, 2013.
- MOKKAPATI, J. S.; BEDNARSKA, A. J.; LASKOWSKI, R.. Physiological and biochemical response of the solitary bee *Osmia bicornis* exposed to three insecticide-based agrochemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 230, p. 113095, 2022.
- MUANGPHRA, P.; SENGSAI, S.; GOONERATNE, R.. Earthworm biomarker responses on exposure to commercial cypermethrin. **Environmental toxicology**, v. 30, n. 5, p. 597-606, 2015.
- MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D.K.; BAYPAYEE, M.; DHAWAN, A.. Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 19, n. 2, p. 85-90, 2004.
- MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.L.; et al.. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e 97-54, 2010.
- PARAVANI, E.V.; POLETTA, G.L.; CASCO, V.H.. Cypermethrin induction of DNA damage and oxidative stress in zebrafish gill cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 1-7, 2019.
- PEREIRA, N. C.; DINIZ, T. O.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.. Sublethal effects of neonicotinoids in bees: a review. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, n. 7, p. 142-152, 2020.
- PEREIRA, N. C.; DINIZ, T. O.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Toxicity and genetic analysis of *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 contaminated with the pyrethroid cypermethrin. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 1, p. 59-66, 2021.
- PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E.M.; ANDRÉ, M.; 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, 2013.
- POTTS, S. G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, G.; et al.. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.
- ROSENKRANZ, P.; AUMEIER, P.; ZIEGELMANN, B..Biology and control of Varroa destructor. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. S96-S119, 2010.

- SANKAR, P.; TELANG, A. G.; MANIMARAN, A.. Curcumin protects against cypermethrin-induced genotoxicity in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 3, p. 289-291, 2010.
- SLAA, E. J.; CHAVES, L.A.S.; MALAGODI-BRAGA, K.S.; et al.. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 293-315, 2006.
- THEMUDO, G.E.; REY-IGLEAIA, A.; TASCÓN, L.R.; et al.. Declining genetic diversity of European honeybees along the twentieth century. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2020.
- TOSI, S.; SGOLASTRA, F.; MEDRZYCKI, C.P.. Neonicotinoid pesticides and nutritional stress synergistically reduce survival in honey bees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1869, p. 2017-1711, 2017.
- VILLAR, S; OJEDA, P.. Measurement of genetic damage in *Apis mellifera* caused by agrochemicals using comet assay. **Toxicology**, v. 15, 2019.
- VOSSLER, F G.; BLETTLER, D.C.; FAGÚNDEZ, G.A.; DALMAZZO, M.. Stingless bees as potential pollinators in agroecosystems in Argentina: inferences from pot-pollen studies in natural environments. In: **Pot-pollen in stingless bee melittology**. Springer, Cham. p. 155-175, 2018.
- WHITEHORN, P. R.; CONNOR, S.O.; WACKERS, F.L.; GOULSON, D.. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 351-352, 2012.
- WINFREE, R.; AGUILAR, R.; VÁZQUEZ, D.P.; et al.. A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. **Ecology**, v. 90, n. 8, p. 2068-2076, 2009.
- YASUDA, M.; SAKAMOTO, Y.; GOKA, K.; et al.. Insecticide susceptibility in Asian honey bees (*Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae)) and implications for wild honey bees in Asia. **Journal of economic entomology**, v. 110, n. 2, p. 447-452, 2017.
- ZAFEIRAKI, E.; KASIOTIS, K.M.; NISIANKIS, P.; et al.. Occurrence and human health risk assessment of mineral elements and pesticides residues in bee pollen. **Food and Chemical Toxicology**, v. 161, p. 112-826, 2022.

4.3 ARTIGO III

Efeitos genotóxicos em abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) associados à poluição atmosférica urbana

Genotoxic effects on stingless bees *Tetragonisca angustula* (Apidae: Meliponini) associated with urban air pollution

Maria das Dores da Silva^{a,b}, Érika Maria de Amorim^b, Maria Gislaine Pereira^b, Aleson Aparecido da Silva^b, Danubia Guimarães da Silva^b, Claudia Rohde^b

^a Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

RESUMO

As intervenções humanas têm aumentado as emissões de poluentes nos ambientes, tanto as provenientes das indústrias quanto dos veículos automotores. A liberação de gases tóxicos na atmosfera desencadeia sérios danos ao meio ambiente, afetando negativamente os principais organismos polinizadores, as abelhas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito genotóxico da poluição ambiental sobre colônias de abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* (Jatai) de uma área urbana do Nordeste do Brasil, por meio do Ensaio cometa. Adultos de três diferentes colônias naturais foram coletados no Parque do Bom Jesus com a ajuda de um sugador elétrico. Para compor o grupo controle negativo foi realizada uma coleta na Área de Preservação Ambiental Aldeia-Beberibe, Pernambuco. Logo após a coleta, os adultos foram encaminhados ao laboratório para serem submetidos à extração da hemolinfa, tratamentos e obtenção dos nucleóides para análise e quantificação dos níveis de danos genéticos. Os resultados indicaram que duas colônias expostas aos estressores ambientais urbanos sofreram danos em seu DNA acima dos níveis observados no grupo controle negativo ambiental. Os resultados indicam que as abelhas nativas Jataí são sensíveis e podem ser consideradas bioindicadoras dos efeitos genéticos deletérios a que os organismos polinizadores estão submetidos em ambientes urbanos, mesmo que o local seja um parque. Os resultados corroboram outros estudos que avaliaram os efeitos negativos da poluição sobre aspectos comportamentais, fisiológicos, cardíacos e de sobrevivência das abelhas.

Palavras-chave: Abelhas sem ferrão; Estressores ambientais; Jatai; Poluentes atmosféricos.

1. INTRODUÇÃO

As abelhas pertencem a ordem Hymenoptera e destacam-se por sua atividade polinizadora, pois são excepcionais ao polinizar plantas e culturas economicamente valiosas (POTTS et al., 2010; GIANNINI et al., 2020) colaborando para os serviços ecossistêmico, economia e segurança alimentar (CAIRES; BARCELOS, 2017), além de fornecer produtos apícolas como o mel, a cera e o própolis. A espécie, *Tetragonisca angustula*, (Nome popular: Jataí) é uma espécie nativa sem ferrão, que se destaca por ser polinizadora de plantas nativas (GIANNINI et al., 2020), e por sua importância como biondicador ambiental (BARBOSA et al., 2021).

Apesar desse cenário de importância das abelhas, as mudanças ambientais decorrentes das atividades antrópicas como desmatamentos, doenças, introdução de espécies exóticas, as alterações climáticas, urbanização e o uso de agrotóxicos (JUCKER; LUPI, 2011; SEIBOLD et al., 2019), poluentes oriundos dos veículos automotores e atividades industriais, estão contribuindo para aumentar a concentração de compostos químicos na troposfera (GUARIEIRO; VASCONCELLOS; SOLCI, 2011), afetando a biodiversidade e serviços ecossistêmicos dos polinizadores (JUCKER; LUPI, 2011; SEIBOLD et al., 2019), sobretudo das abelhas, as quais estão sujeitas a um fenômeno intrigante de declínio (VANENGELSDORP et al., 2009; RATNIEKS CARRECK, 2010;).

O tráfego veicular é considerado uma das vias que mais lança contaminantes para o meio ambiente, afetando tanto as abelhas quanto seus produtos apícolas. A emissão de gases descarrega metais pesados e material particulado (PM), como os óxidos/hidróxidos provenientes do sistema de freio dos veículos (PAPA et al., 2021), assim como dióxido de enxofre (SO₂), óxidos de nitrogênio (NO_x) e ozônio (O₃) (ESCUDERO et al., 2016), que comprometem tanto a saúde humana quanto os agentes polinizadores (PAPA et al., 2021).

Particularmente, as abelhas são um grupo afetado pela poluição do ar, pois durante o forrageamento entram em contato com diversos elementos tóxicos suspensos (NEGRI et al. 2015; PAPA et al. 2021), podendo ser por meio do néctar, pólen ou água, consumidos em sua alimentação (SKORBIŁOWICZ; SKORBIŁOWICZ; CIEŚLUK, 2018). Alguns efeitos adversos dos poluentes atmosféricos, como os óxidos de nitrogênio e ozônio, comprometem o forrageio das abelhas, pois podem alterar quimicamente os odores florais (RYALLS et al., 2022), interferindo na interação planta-polinizador intercedidas por pistas olfativas e visuais (BLANDE, 2020). Além disso, a aprendizagem e memória olfativa das abelhas podem ser

comprometida quando os organismos estão expostos aos poluentes atmosféricos, como demonstrado por Leonard et al. (2019).

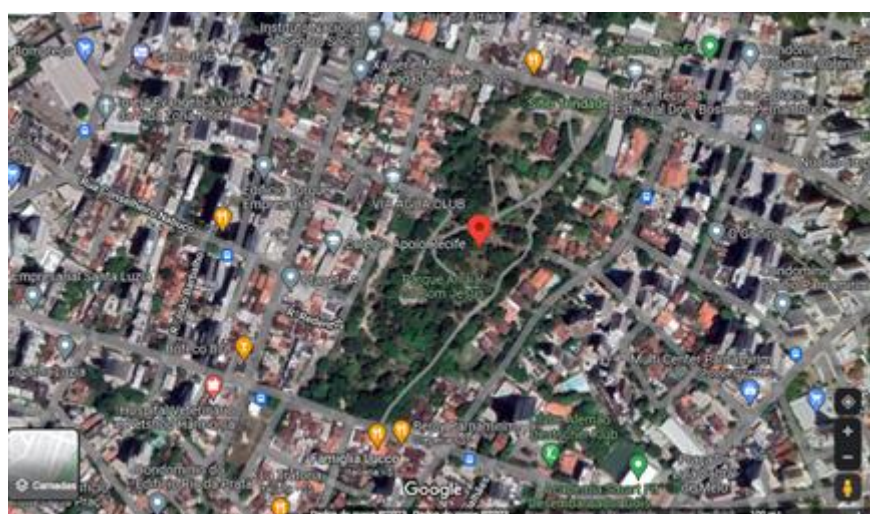
Assim, as interferências negativas das atividades antrópicas, provenientes de cultivos agrícolas, das indústrias e dos veículos automotores, lançam ao meio uma série de compostos químicos, especialmente nos grandes centros urbanos. As abelhas vêm sendo afetadas por esta poluição e, como consequência, suas populações estão reduzindo nas últimas décadas, um fato extremamente preocupante se considerarmos que elas são essenciais ao processo de polinização. Nesse contexto, este trabalho buscou avaliar os possíveis efeitos genotóxicos associados à poluição urbana em abelhas *T. angustula*, por meio do Ensaio cometa, uma técnica recém aplicada para a espécie, e muito eficaz na análise de danos ao DNA dos organismos (CESCHI-BERTOLI et al., 2020).

2. MATERIAL e MÉTODOS

2.1 Amostragem e Coleta

Abelhas adultas da espécie nativa *Tetragonisca angustula* foram coletadas em dezembro/2022 (estação seca) no Parque Arraial do Bom Jesus (coordenadas -8,029964, -34.912581) (**Figura 1**), situado no Bairro de Casa Amarela, Recife, capital de Pernambuco, Brasil.

Figura 1. Mapa parcial da cidade do Recife, com indicação da área verde do Parque do Arraial do Bom Jesus, o local aproximado da coleta de adultos *Tetragonisca angustula*.



No parque, uma colônia de Jataí estava inserida em fenda da árvore centenária Jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam) a 2m do chão, uma colônia estava inserida em

árvore de *Ficus* sp. a 40 cm do chão, e uma colônia em tronco cortado de jaqueira a 20 cm do chão (**Figura 2**).

Figura 2. Aspectos das três colônias naturais de abelhas jataí no parque urbano de Recife, Pernambuco.



Fonte: Silva (2023)

Após a coleta, feita com auxílio de um aspirador entomológico elétrico (Horst Armadilhas Ltda, São Paulo, Brazil), as abelhas foram transferidas do sugador para tubos de vidro com o auxílio de um funil, se movimentando naturalmente para o tubo, em direção a luz. Os vidros foram fechados com tampas plásticas e rolhas, a fim de permitir a circulação de ar, e o material biológico foi levado em caixas térmicas até o Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, para processamento do Ensaio cometa. Uma amostra de abelhas Jataí cultivada em apiário foi coletada em residência situada junto à Área de Proteção Ambiental Aldeia-Beberibe, Paudalho, Pernambuco, para compor o grupo controle negativo ambiental. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.2 Ensaio cometa

Para o processamento da hemolinfa, as abelhas foram colocadas no refrigerador a 4° C por 1 min para redução da atividade metabólica. Em seguida, foram transferidas para uma placa escavada e com auxílio de uma lupa para a visualização dos adultos, uma pinça de relojoeiro nº 5 e um bisturi, tiveram a cabeça e o tórax perfurados e pressionados para a extração da hemolinfa, junto com solução de EDTA (200 µL) para evitar a coagulação do fluido. Para cada réplica, o material biológico coletado do *pool* celular de 35 indivíduos juntos foi transferido para tubos de microcentrífuga com o auxílio de uma micropipeta. Os tubos foram submetidos à centrifugação por duas vezes, a 3.000 rpm por 3 min.

Após a centrifugação, aproximadamente 60 µL do material biológico foi homogeneizado em 100 µL de solução de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point*) a 0,5%. O material homogeneizado foi espalhado sobre lâminas, previamente preparadas (lixadas, lavadas e banhadas em agarose padrão 1,5%, diluída em 100 mL de solução salina tamponada com fosfato- PBS). Sobre o material, foi adicionada uma lamínula (24 mm x 60 mm), e o conjunto mantido a 4°C, por 10 min, para solidificar a agarose. Após remoção das lamínulas, as lâminas com o material biológico foram imersas em cubeta vertical contendo solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 1% Tris pH 10; 1% Triton X-100 e 10% DMSO), permanecendo por 48 h, a 4°C. Posteriormente, lâminas foram alinhadas horizontalmente em uma cuba de 40 cm, com a superfície fosca virada para cima e voltadas para a direção polo positivo (ânodo), sendo adicionada uma solução de tampão de eletroforese (1 M NaOH; 200 mM EDTA pH>13) para estabilização, por 20 min. A corrida eletroforética se deu em 40 V e 300 mA, durante por 20 min. Ao término da eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e submetidas a uma solução de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 min, em seguida imersas em etanol absoluto para fixação por 5 min, secas ao ar e armazenadas em um laminário a 4° C até o momento da análise microscópica. Nessa etapa, as lâminas foram coradas com 50 µL de GelRed (Biotium), diluído em água purificada (1:500) e observadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, equipado com o filtro Alexa-Fluor 546 com aumento de 400X.

Os cometas observados foram classificados de acordo com a integridade da cabeça e comprimento da cauda em 5 níveis que variam de 0 (ausência e dano) a 4 (maior nível de dano). No total, 100 nucleóides foram observados (50 em cada uma de duas lâminas) para cada réplica, totalizando 300 células analisadas por cada grupo. Os níveis de dano observados foram tabulados em arquivo Excel, e calculados os parâmetros Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%), de acordo com as fórmulas a seguir:

$$\text{ID: } 0. (\text{n}^\circ \text{ danos } 0) + 1. (\text{n}^\circ \text{ danos } 1) + 2. (\text{n}^\circ \text{ danos } 2) + 3(\text{n}^\circ \text{ danos } 3) + 4. (\text{n}^\circ \text{ danos } 4)$$

$$\text{FD\%: } \frac{(\text{n}^\circ \text{ total de danos} - \text{n}^\circ \text{ de danos } 0). 100}{\text{n}^\circ \text{ total de danos}}$$

A análise estatística foi realizada no programa STATA 14.2, utilizando o Teste ANOVA e o pós-teste de Bonferroni para as comparações para a par.

3.RESULTADOS

Os resultados do Índice de Dano e Frequência de Dano de representantes da espécie de abelhas *Tetragonisca angustula* coletadas no ambiente urbano do Parque Arraial do Bom Jesus e na Área de Proteção Ambiental Aldeia-Beberibe, estão apresentados na **Tabela 1**. A amostra obtida da APA Aldeia-Beberibe apresentou baixos níveis de dano (ID=41,0; FD%=35,67), sem presença de danos dos danos mais altos (3 e 4). Os resultados obtidos para Colônia 1 do parque urbano, foram semelhantes ao grupo controle negativo, com ID=39,33. Porém, foi significativamente menor para FD% (=20,33) em relação ao grupo controle, mesmo que nessa colônia 1 tenham ocorrido danos de nível 3 e 4, refletindo maior agressão ao DNA.

Diferente da Colônia 1, as abelhas coletadas nas Colônias 2 e 3 se mostraram mais afetadas pela condição do local, com elevada incidência de lesões, sobretudo, das classes mais graves ao material genético (3 e 4), que se refletiram em valores mais altos de ID e FD%. Entretanto, foi a Colônia 2 que apresentou quantidades expressivas de danos (ID=143; FD%=56,33), que foram superiores a todos os demais grupos (controle negativo, Colônia 1 e Colônia 2). Por alguma razão específica, a Colônia 2, coletada próxima à base de *Ficus* sp, foi a mais afetada para danos no DNA. A **Tabela 2** apresenta os resultados da análise estatística (pós-teste de Bonferroni) das comparações par a par entre todos os grupos, para valores médios do ID e FD%.

Tabela 1. Valores médios calculados para cada um dos níveis de dano (0 a 4) e para os valores calculados de Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) observados em hemócitos de adultos de *Tetragonisca angustula*, após coleta no ambiente urbano de Recife, e na Área de Proteção Ambiental Aldeia-Beberibe (controle negativo). Asteriscos indicam valores de ID ou FD% diferentes do grupo controle negativo ($P \leq 0,05$).

Grupos	Danos genéticos					ID	FD %	
	0	1	2	3	4			
Controle negativo								
Média	64,33	30,33	5,33	0,00	0,00	41,00	35,67	
Desvio Padrão	7,64	4,16	4,73	0,00	0,00	12,00	7,64	
Colônia 1								
Média	79,67	7,67	6,67	5,67	0,33	39,33	20,33*	
Desvio Padrão	2,89	3,79	1,53	2,52	0,58	8,39	2,89	
Colônia 2								
Média	43,67	11,33	13,67	21,00	10,33	143,00*	56,33*	
Desvio Padrão	1,53	4,73	2,31	2,00	3,21	10,44	1,53	
Colônia 3								
Média	68,33	4,33	4,33	12,00	11,00	93,00*	31,67	
Desvio Padrão	3,21	1,15	1,15	1,73	3,61	14,80	3,21	

Tabela 2. Análise do pós-teste de Bonferroni para comparações par a par dos valores médios de Índice de Dano (abaixo da diagonal, a esquerda) e Frequência de Dano (acima da diagonal, a direita) entre os grupos controle negativo (coletado em local preservada) e Colônias 1, 2 e 3 (coletadas no parque urbano na cidade do Recife).

Grupos	Controle negativo	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3
Controle negativo		0,018*	0,003*	1,000
Colônia 1	1,000		0,0001*	0,086
Colônia 2	0,0001*	0,0001*		0,001*
Colônia 3	0,004*	0,003*	0,005*	

*Diferença significativa ($P \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Conforme os resultados obtidos, as abelhas jataí da Colônia 2 amostrada na zona urbana tem danos genotóxicos elevados em seu material genético, seguida pela Colônia 3. Isto indica, indiretamente, a condição genotóxica associada a poluição urbana no entorno do parque. Em contrapartida, as abelhas coletadas na Área de Proteção Ambiental em Aldeia não apresentaram lesões significativas no DNA. Este resultado era esperado, uma vez que se trata de um ambiente conservado. Curiosamente, o mesmo ocorre com os espécimes coletados na Colônia 1, a qual apresenta um índice de dano muito baixo em comparação aos outros pontos, sendo FD% menor que o próprio controle negativo ambiental.

Cabe destacar que abelhas operárias conseguem percorrer distâncias de aproximadamente 2 km para além de suas colônias, inspecionando diariamente matrizes como solo, água, ar e vegetação, entrando em contato com diversos possíveis poluentes ambientais (GIROTTI et al., 2020). Por serem independentes, cada Colônia pode buscar alimento próximo a fontes mais ou menos poluentes. Também é possível considerar a hipótese de que as abelhas da Colônia 1 sejam mais jovens, e não se mantiveram expostas por tempo suficiente para que seu material genético viesse a ser comprometido. Ou, ainda, que sua condição genética favoreça uma maior resistência ao efeito de poluentes. Por fim, pode-se considerar também que uma micro condição climática nos locais, dependentes da maior ou menor incidência de chuvas e ventos, propicie exposição diferenciada das colônias aos

agentes poluentes, já que a chuva pode atuar como purificadores da atmosfera, favorecendo a deposição de partículas suspensas (GIGLIO et al., 2017).

Os efeitos genotóxicos observadas nas Colônias 2 e 3 do Parque Arraial do Bom Jesus atestam para a sensibilidade das abelhas aos efeitos de poluentes atmosféricos urbana. Este achado é respaldado pelo estudo guiado por Sposito et al. (2017), no qual foi comprovado a genotoxicidade e mutagenicidade da poluição urbana em inflorescências e folhas da espécie vegetal *Tradescantia pallida*, por meio dos ensaios cometa e micronúcleo. Ademais, uma investigação realizada por Santana et al. (2018) no centro comercial de uma cidade do interior de Pernambuco, corrobora os efeitos genotóxicos da poluição atmosférica no organismo-modelo *Drosophila melanogaster*, em dois anos distintos de estudos.

Os efeitos genotóxicos observados no presente estudo podem estar associados aos gases poluentes, como dióxido de enxofre, óxidos de nitrogênio, ozônio, monóxido de carbono, ou por compostos orgânicos voláteis, ou por materiais particulados (entre eles MP_{2,5} e MP₁₀). A exposição, sobretudo ao material particulado, está fortemente associada ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à indução de danos no DNA (RISOM et al., 2005, MOLLER; LOFT, 2010). O mesmo acontece com elementos como o dióxido de nitrogênio e ozônio, cádmio, manganês e cobalto (CARVALHO et al., 2018). Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs), compostos presentes nos particulados também constituem um grupo preocupante causadores de danos genéticos (HUANG et al., 2012). Os resultados aqui apresentados abrem novas perspectivas de estudos com abelhas *T. angustula*, que podem ser feitos no parque urbano de Recife, visto a grande quantidade de colônias no local, devido as inúmeras árvores centenárias ali preservadas.

Visto que a poluição atmosférica pode interferir em aspectos atrelados a sobrevivência, comportamento de forragem, expressão gênica, frequência cardíaca e níveis de hemócitos, tal como observado por Thimmegowda et al. (2021) na abelha *Apis dorsata*, abelhas Jataí de Recife são boas candidatas a estudos nestas linhas de pesquisa. Devido às restrições alimentarem de um ambiente urbano, o hábito de forragear é ainda mais imprescindível para as abelhas urbanas, e aproxima esses polinizadores de uma gama de elementos tóxicos do ar. Tais elementos podem ficar retidos na superfície do corpo das abelhas, especialmente nos pelos, serem inaladas através dos espiráculos do sistema traqueal ou ingeridas por meio da alimentação (pólen, água, néctar). Dessa forma, as próprias abelhas contaminam suas colônias (BOLOGNESI, 2003; JOHNSON, 2015).

Devido aos atributos peculiares das abelhas, elas têm se tornado bioindicadores ambientais valiosos. Barbosa et al. (2021) investigaram como se encontrava a qualidade do ar em oito regiões de um corredor ecológico no *hotspot* de Biodiversidade da Mata Atlântica, em São Paulo, Brasil. Para tanto, foram usadas abelhas *T. angustula* como bioindicadores e foram encontrados 21 elementos químicos acumulados no corpo, advindos de construção de rodovias, manejo do solo, pastagens e urbanização. Dentre eles, destacaram-se o Mercúrio (Hg), Chumbo (Pb), Cromo (Cr), Urânio (U), Antimônio (Sb) e Arsênio (As), evidenciando como o paisagismo antropizado pode induzir o acúmulo de metais tóxicos nas abelhas.

Diante deste cenário, é necessário que a sociedade reflita sobre a saúde e preservação de todos os organismos que vivem nos ambientes urbanos, e para a necessária redução e controle dos poluentes atmosféricos.

5. CONCLUSÃO

Este estudo traz informações acerca da qualidade ambiental urbana onde se encontram colônias de organismos polinizadores, especialmente as abelhas. A averiguação da genotoxicidade associada à poluição urbana em abelhas adultas *Tetragonisca angustula*. Sendo assim, mais estudos seguindo esse viés são necessários, na tentativa de reduzir e/ou monitorar as emissões de poluentes e suas consequências negativas para os polinizadores e demais organismos.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, M.; FERNANDES, A.C.C.; ALVES, R.S.C.; et al.. Effects of native forest and human-modified land covers on the accumulation of toxic metals and metalloids in the tropical bee *Tetragonisca angustula*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 215, p. 112147, 2021.
- BILUCA, F. C. SILVA, B; CAON, T.;et al.. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). **Food Research International**, v. 129, p. 108-756, 2020.
- BLANDE, J. D..Effects of air pollution on plant–insect interactions mediated by olfactory and visual cues. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 19, p. 100-228, 2021.
- BOLOGNESI, C.. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 54, v. 3, p. 251-272, 2003.
- CAIRES, S. C.; BARCELOS, D.. Colapso das abelhas: Possíveis causas e consequências do seu desaparecimento na natureza. **ACTA Apicola Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 11, 2017.
- CARVALHO, R. B.; CARNEIRO, M. F. H.; BARBOSA, F.; et al.. The impact of occupational exposure to traffic-related air pollution among professional motorcyclists from

- Porto Alegre, Brazil, and its association with genetic and oxidative damage. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 18620-18631, 2018.
- CESCHI-BERTOLI, L.; VIDAL, F.A.P.; BALSAMO, P.J.; ABDALLA, F.C.. Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury. **Chemosphere**, v. 261, p. 127-752, 2020
- ESCUDERO, M.; LOZANO, A.; HIERO, I.; et al..Assessment of the variability of atmospheric pollution in National Parks of mainland Spain. **Atmospheric Environment**, v. 132, p. 332-344, 2016.
- GIANNINI, T.C.; ALVEZ, D.A.; CORDEIRA, G.D.; et al..Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. **Apidologie**, v. 51, n. 3, p. 406-421, 2020.
- GIGLIO, A.; AMMENDOLA, A.; BATTISTELLA, S.; et al..*Apis mellifera ligustica*, Spinola 1806 as bioindicator for detecting environmental contamination: a preliminary study of heavy metal pollution in Trieste, Italy. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 659-665, 2017.
- GIROTTI, S.; GHINI, S.; FERRI, E.; et al.. Bioindicators and biomonitoring: honeybees and hive products as pollution impact assessment tools for the Mediterranean area. **Euro-Mediterr J Environ Integr**, v. 5, p.62, 2020.
- GUARIEIRO, L. LN; VASCONCELLOS, P. C.; SOLCI, M. C.. Poluentes atmosféricos provenientes da queima de combustíveis fósseis e biocombustíveis: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 434-445, 2011.
- HUANG, H-B.; LAI, C-H.; CHEN, G-W.; et al.. Traffic-Related Air Pollution and DNA Damage: A Longitudinal Study in Taiwanese Traffic Conductors. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37412, 2012.
- JERNIGAN, C. M.; BIRGIOLAS, J.; MCHUH, C.; et al.. Colony-level non-associative plasticity of alarm responses in the stingless honey bee, *Tetragonisca angustula*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 72, n. 3, p. 1-14, 2018.
- JOHNSON, R. M. Honey Bee Toxicology. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 415-434, 2015.
- JUCKER, C.; LUPI, D.. Exotic insects in Italy: an overview on their environmental impact. **The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity. InTech**, p. 51-74, 2011.
- MOLLER, P.; LOFT, S.. Oxidative damage to DNA and lipids as biomarkers of exposure to air pollution. **Environ. Health Perspect**, v. 118, n. 8, p. 1126+, 2010.
- PAPA, G.; GIANCORLO, C.; CAPRI, E.; PELECHIA, M.; NEGRI, I.; et al.. Vehicle-derived ultrafine particulate contaminating bees and bee products. **Science of the Total Environment**, v. 750, p. 141-700, 2021.
- POTTS, S. G.; BIESMESJER, J.C.; HREMER, C.; NEUMANN, P.;et al..Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.
- RATNIEKS, F. LW.; CARRECK, N.L.. Clarity on honey bee collapse? **Science**, v. 327, n. 5962, p. 152-153, 2010.
- RISOM, L.; MØLLER, P.; LOFT, S.. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. **Mutation Research**, v. 592, n. 1, p. 119-137, 2005.

RYALLS, J. MW.; LANGFORD, B.; MULLINGER, N.J.; BROMFIELD, L.M.; et al..Anthropogenic air pollutants reduce insect-mediated pollination services. **Environmental Pollution**, v. 297, p. 118847, 2022.

SANTANA, S. L.; VERÇOSA, C. J.; CASTRO, I. F. A.; et al.. *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 32409-32417, 2018.

SEIBOLD, S.; GOSSNER, M.M.; SIMONS, N.K.; BLUTHGEN, N.;et al.. Arthropod decline in grasslands and forests is associated with landscape-level drivers. **Nature**, v. 574, n. 7780, p. 671-674, 2019.

SKORBIŁOWICZ, E.; SKORBIŁOWICZ, M.; CIEŚLUK, I..Bees as bioindicators of environmental pollution with metals in an urban area. **Journal of Ecological Engineering**, v. 19, n. 3, 2018.

SPOSITO, J. C. V.; CRISPIM, B. A.; ROMĂN, A. I.; et al.. Evaluation the urban atmospheric conditions in different cities using comet and micronuclei assay in *Tradescantia pallida*. **Chemosphere**, v. 175, p. 108-113, 2017.

THIMMEGOWDA, G. G.; MULLEN, S.; SOTTILARE, K.; et al.. A field-based quantitative analysis of sublethal effects of air pollution on pollinators. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 34, p. 20653-20661, 2020.

VANENGELSDORP, D.V.; EVANS, J.D.; SAEGEMAN, C.; MULLIN, C.; et al.. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PloS One**, v. 4, n. 8, p. e6481, 2009.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo tornou possível validar a metodologia do Ensaio cometa em adultos da abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* comprovando que essa espécie é sensível a diferentes concentrações de pesticidas e à poluentes atmosféricos urbanos, e sofrem danos genotóxicos dependendo das concentrações testadas e condições ambientais.

Os resultados obtidos neste estudo contribuem com novas informações acerca dos impactos que agentes estressores ambientais e agrotóxicos podem ocasionar às abelhas e ao desempenho de seu papel essencial como polinizadores.

Por fim, esses dados fornecerem subsídios para estudos futuros na área da mutagênese com abelhas, ainda bastante incipiente apesar da rica diversidade de espécies no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABATI, R.; SAMPAIO, A. R.; MACIEL, R. M. A.; et al.. Bees and pesticides: The research impact and scientometrics relations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 25, p. 32282-32298, 2021.
- ALBURAKI, M.; STECKEL, S. J.; WILLIAMS, M. T.; SKIMER, J. A.; et al. Agricultural landscape and pesticide effects on honey bee (Hymenoptera: Apidae) biological traits. **Journal of economic entomology**, v. 110, n. 3, p. 835-847, 2017.
- ALI, T.; ISMAIL, M.; ASAD, F.; et al.. Pesticide genotoxicity in cotton picking women in Pakistan evaluated using comet assay. **Drug and chemical toxicology**, v. 41, n. 2, p. 213-220, 2018.
- ASCHER J.S., PICKERING J. Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Apoidea: Anthophila). Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20q?guide=Apoidea_species> Acesso em 25/01/2023.
- BENCSIK, A.; LESTAEVEL, P.; CANU, I. G.. Nano-and neurotoxicology: An emerging discipline. **Progress in Neurobiology**, v. 160, p. 45-63, 2018.
- BENNETT, J. M; STEETS, J.A; BURNS, J.H.; et al.. Land use and pollinator dependency drives global patterns of pollen limitation in the Anthropocene. **Nature Communications**, v. 11, 3999, 2020.
- BERNIERI, T.; MORAES, M. F.; ARDENGH, P. G.; SILVA, L. B.. Assessment of DNA damage and cholinesterase activity in soybean farmers in southern Brazil: High versus low pesticide exposure. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, n. 4, p. 355-360, 2020.
- BHUTIA, D; RAI B. K.; PAL J. Detection of multiple cytochrome P450 in hepatic tissue of *Heteropneustes fossilis* (Bloch) exposed to Cypermethrin. **Proc. Zool. Soc.**, v. 66, n. 1, p. 14-19, 2013.
- BILUCA, F.C.; BRAGHINI, F.; GONZAGA, L.V.; et al.. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61-69, 2016.
- BILUCA, F.C.; GOIÁS, J.S.; SCHULZ, M.; et al.. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89-97, 2017.
- BILUCA, F.C.; SILVA, B.; CAON.; et al.. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). **Food Research International**, v. 129, p. 108-756, 2020.
- BLANDE, J. D.. Effects of air pollution on plant–insect interactions mediated by olfactory and visual cues. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 19, p. 100-228, 2021.
- BLOMQUIST, G. J.; GINZEL, M. D. Chemical ecology, biochemistry, and molecular biology of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, v. 66, p. 45-60, 2021.
- BOLOGNESI, C.. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 543, n. 3, p. 251-272, 2003.

- BROWN, J.C.; DE OLIVEIRA, M.L.. The impact of agricultural colonization and deforestation on stingless bee (Apidae: Meliponini) composition and richness in Rondônia, Brazil. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 172-188, 2014.
- BUTLER, D.. EU expected to vote on pesticide ban after major scientific review. **Nature**, v. 555, n. 7697, p. 150-152, 2018.
- CAMARGO, J.M.F., PEDRO, S.R.M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure, J.S., Urban, D., Melo, G.A.R. (Eds.), **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. 2013. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>> Acesso em 27/01/2023.
- CAMERON, S. A.; LOZIR, J. D.; STRANGE, J.P.; et al.. Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 662-667, 2011.
- CAPPA, F.; PETROCELI, I.; DANI, F.R.; et al.. Natural biocide disrupts nestmate recognition in honeybees. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.
- CARVALHO, A. F.; DEL LAMA, M. A.. Predicting priority areas for conservation from historical climate modelling: stingless bees from Atlantic Forest hotspot as a case study. **Journal of Insect Conservation**, v. 19, n. 3, p. 581-587, 2015
- CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B.. Golden age of insecticide research: Past, Present, or future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1998.
- CASTANHEIRA, E. B.; CONTEL, E. P. B.. Geographic variation in *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Journal of Apicultural Research** v. 44, n.3, p. 101-105, 2005.
- CASTRO, M. B. A.; MARTINEZ, L.C.; COSSOLIN, J.F.; et al.. Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. **Chemosphere**, v. 248, p. 126-075, 2020.
- CESCHI-BERTOLI, L.; VIDAL, F. A. P.; BALSAMO, P. J.; ABDALLA, F.C.. Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury. **Chemosphere**, v. 261, p. 127752, 2020.
- CHRISTEN, V; FENT K. Exposure of honey bees (*Apis mellifera*) to different classes of insecticides exhibit distinct molecular effect patterns at concentrations that mimic environmental contamination. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 48-59, 2017.
- CIARLO, T. J.; MULLIN, C.A.; FRAZIER, J.L.; SCHMEHL, D.R.. Learning impairment in honey bees caused by agricultural spray adjuvants. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40848, 2012.
- COLLINS, A. R.. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.
- COLLINS, A. R.. The comet assay. **In situ detection of DNA damage**, p. 163-177, 2002.
- CUNNINGHAM, M. M.; TRAN, L.; MCKEE, C.G.; et al.. Honey bees as biomonitors of environmental contaminants, pathogens, and climate change. **Ecological Indicators**, v. 134, p. 108457, 2022.
- DABORN, P. J.; LUMB, C.; HARROP, T.; et al.. Using *Drosophila melanogaster* to validate metabolism-based insecticide resistance from insect pests. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 12, p. 918-924, 2012.

- DAI, P.; WANG, Q.; SUN, J.H.; et al.. Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee *Apis mellifera ligustica*. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 29, n. 3, p. 644-649, 2010.
- DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G.. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 5, p. 1402-1419, 2011.
- DASHTIPOUR, K.; LIU, M.; KANI, C.; et al.. Iron accumulation is not homogenous among patients with Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, v. 2015, p. 8, 2015.
- DIVELY, G. P.; KAMEL, Al.. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4449-4456, 2012.
- DOCEA, A. O.; VASSILOPOULOU, L.; FRANGOU, D.; et al.. CYP polymorphisms and pathological conditions related to chronic exposure to organochlorine pesticides. **Toxicology reports**, v. 4, p. 335-341, 2017.
- DORNELES, A. L.; ROSA-FONTANA, A.S.; 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.
- EPA (United States Environmental Protection Agency). **Ingredients Used in Pesticide Products**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products>> Acesso em 21/8/2020.
- ESCUADERO, M.; LOZANO, A.; HIERRO, J.; et al.. Assessment of the variability of atmospheric pollution in National Parks of mainland Spain. **Atmospheric Environment**, v. 132, p. 332-344, 2016.
- FELTHAM, H.; PARK, K.; GOULSON, D.. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 317-323, 2014.
- FENT. K; SCHMID. M; CHRISTEN. V.. Global transcriptome analysis reveals relevant effects at environmental concentrations of cypermethrin in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Pollution**, v. 259, p. 1-9, 2020
- FLETCHER, M. T. HUNGERFORD, N.L.; WEBBER, M.C.J.; et al.. Stingless bee honey, a novel source of trehalulose: A biologically active disaccharide with health benefits. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2020.
- GARCÍA-GARCÍA, C. R.; PARRÓN, T.; REQUENA, M.; et al.. Occupational pesticide exposure and adverse health effects at the clinical, hematological and biochemical level. **Life Sciences**, v. 145, p. 274-283, 2016.
- GIANNINI, T. C.; ALVEZ, D.A.; ALVEZ, R.; et al.. Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. **Apidologie**, v. 51, n. 3, p. 406-421, 2020.
- GIANNINI, T. C.; TAMBOSI, L.R.; ACOSTA, A.L.; et al.. Safeguarding ecosystem services: a methodological framework to buffer the joint effect of habitat configuration and climate change. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129-225, 2015.
- GIGLIO, A.; AMENDOLA, A.; BATTISTELLA, S.; et al.. *Apis mellifera ligustica*, Spinola 1806 as bioindicator for detecting environmental contamination: a preliminary study of heavy

metal pollution in Trieste, Italy. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 659-665, 2017.

GILL, R. J.; RAMOS-RODRIGUEZ, O.; RAINE, N. E.. Combined pesticide exposure severely affects individual-and colony-level traits in bees. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 105-108, 2012.

GIZAW, G.; KIM, Y.; MOON, K.; et al.. Effect of environmental heavy metals on the expression of detoxification-related genes in honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 51, n. 4, p. 664-674, 2020.

GODFRAY, H.C.J.; BEDDINGTON, J.R.; CRUTE, I.R.; et al.. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 812-818, 2010.

GODOY, F. R.; NUNES, H.F.; ALVES, A.A.; et al.. Increased DNA damage is not associated to polymorphisms in OGG1 DNA repair gene, CYP2E1 detoxification gene, and biochemical and hematological findings in soybeans farmers from Central Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 26, p. 26553-26562, 2019.

GONÇALVES, M. W.; CAMPOS, C.B.M.; GODOY, F.R.; et al.. Assessing genotoxicity and mutagenicity of three common amphibian species inhabiting agroecosystem environment. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 77, p. 409-420, 2019.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOLÍAS, C.; RATHERAY, E.L.. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

GRÜTER, C.. Stingless bees. **Cham, Switzerland: Springer International Publishing**, 2020.

GRÜTER, C.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; RATNIEKS, F..L.W.. A morphologically specialized soldier caste improves colony defense in a neotropical eusocial bee. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1182-1186, 2012.

GUARIEIRO, L.L.N.; VASCONCELLOS, P. C.; SOLCI, M. C.. Poluentes atmosféricos provenientes da queima de combustíveis fósseis e biocombustíveis: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 434-445, 2011.

HAMMEL, B.; VOLLET-NETO, A.; MENEZES, C.; et al.. Soldiers in a stingless bee: work rate and task repertoire suggest they are an elite force. **The American Naturalist**, v. 187, n. 1, p. 120-129, 2016.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; et al.. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348-350, 2012.

JACOB, C.R.; ZANARDI, O.Z.; MALAQUIAS, J.B.; et al..The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille)(Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 224, p. 65-70, 2019.

JAN, R.; ROY, R.; BHOR, R.; et al.. Toxicological screening of airborne particulate matter in atmosphere of Pune: reactive oxygen species and cellular toxicity. **Environmental Pollution**, v. 261, p. 113724, 2020.

JERNIGAN, C.M.; BIRGIOLAS, J.; MCHUGH, C.; et al.. Colony-level non-associative plasticity of alarm responses in the stingless honey bee, *Tetragonisca angustula*. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 72, n. 3, p. 1-14, 2018

- JESCHKE, P.; NAUEN, R.. Neonicotinoids—from zero to hero in insecticide chemistry. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 11, p. 1084-1098, 2008.
- JOHNSON, R.M.; WEN, Z.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R.. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 4, p. 1046-1050, 2006.
- KAPELEKA, J. A.; SAULI, E.; NDAKIDEMI, P. A.. Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 31, n. 7, p. 805-822, 2021.
- KÄRCHER, M. H.; RATNIEKS, F. L. W.. Standing and hovering guards of the stingless bee *Tetragonisca angustula* complement each other in entrance guarding and intruder recognition. **Journal of apicultural research**, v. 48, n. 3, p. 209-214, 2009.
- KHANAL, G.; SINGH, A.. Patterns of pesticide use and associated factors among the commercial farmers of Chitwan, Nepal. **Environmental health insights**, v. 10, n. S1, p. 1-7, 2016.
- KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B.E.; CANE, J.H.; et al.. 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.
- LEITE, D. T.; SAMPAIO, R.B.; CHAMBO, E.D.; AGUIAR, C.M.L; et al.. Toxicity of chlorpyrifos, cyflumetofen, and difenoconazole on *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) under laboratory conditions. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, n. 1, p. 435-443, 2022.
- LEONHARDT, S. D.. Chemical ecology of stingless bees. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 4, p. 385-402, 2017.
- LI, H.; CHENG, F.; WEI, Y.; LYDY, M.J.; YOU, J.. Global occurrence of pyrethroid insecticides in sediment and the associated toxicological effects on benthic invertebrates: An overview. **Journal of Hazardous Materials**, v. 324, p. 258-271, 2017.
- LIAO, C-H.; HE, X. J.; WANG.; et al.. Short-term exposure to lambda-cyhalothrin negatively affects the survival and memory-related characteristics of worker bees *Apis mellifera*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 75, p. 59-65, 2018.
- LU, X.; ZHANG, L.; SHEN, L.. Meteorology and climate influences on tropospheric ozone: a review of natural sources, chemistry, and transport patterns. **Current Pollution Reports**, v. 5, n. 4, p. 238-260, 2019.
- MAHER, B. A.; AHMED, I. A. M.; KARLOUKOVSKI, V.; et al.. Magnetite pollution nanoparticles in the human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 39, p. 10797-10801, 2016.
- MALAGODI-BRAGA, K. S.; KLEINERT, A. M. P. C.. *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be effective as strawberry pollinator in greenhouses? **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 55, n. 7, p. 771-773, 2004.
- MARTINELLO, M.; MANZINELLO, C.; DAINESE, N.; et al.. The honey bee: an active biosampler of environmental pollution and a possible warning biomarker for human health. **Applied Sciences**, v. 11, n. 14, 6481, 2021.
- MICHENER, C.D.. The Meliponini. In: VIT, P., PEDRO, S.R.M., ROUBIK, D. (eds) **Pot-Honey. Pot-Honey. A legacy of stingless bees**. Springer, New York, NY. Disponível em https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4960-7_1, 2013.

MILHOME, M. A. L.; SOUSA, D.O.B.; LIMA, F.A.F.; NASCIMENTO, R.F.N.. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 14, p. 363-372, 2009.

MOKKAPATI, J. S.; BEDNARSKA, A. J.; LASKOWSKI, R.. Physiological and biochemical response of the solitary bee *Osmia bicornis* exposed to three insecticide-based agrochemicals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 230, p. 113095, 2022.

MØLLER, P..The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, n. 4, p. 336-345, 2006.

NASCIMENTO, F.A.; ALVES, A.A.; NUNES, H.F.; et al.. Cultivated areas and rural workers' behavior are responsible for the increase in agricultural intoxications in Brazil? Are these factors associated?. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 38064-38071, 2020.

NEWCOMB, R.D.; CAMPBELL, P.M.; OLLIS, D.L.; et al.. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 14, p. 7464-7468, 1997

NORDIN, A.; SAINIK, N.Q.A.V.; CHOWDHURY, S.; et al.. Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 73, p. 91-102, 2018.

OSTLING, O; JOHANSON, K.J.. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PADILHA, A. C.; PIOVESON, B.; MORAIS, M.C.; et al.. Toxicity of insecticides on neotropical stingless bees plebeia emerina (Fries) and *Tetragonisca fiebrigi* (Schwarz) (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Ecotoxicology**, v. 29, p. 119-128, 2020.

PAPA, G.; CAPITÃO, G.; PELECCHIA, M.; et al.. Vehicle-derived ultrafine particulate contaminating bees and bee products. **Science of the Total Environment**, v. 750, p. 141-700, 2021.

PASIANI, J.O.; TORRES, P.; SILVA, J.R.; et al..Knowledge, attitudes, practices and biomonitoring of farmers and residents exposed to pesticides in Brazil. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, v. 9, n. 9, p. 3051-3068, 2012.

PATRÍCIO-ROBERTO, G.B.; CAMPOS, M.J.O.. Aspects of landscape and pollinators-what is important to bee conservation? **Diversity**, v. 6, n. 1, p. 158-175, 2014.

PAUMGARTTEN, F.J.R.. Pesticides and public health in Brazil. **Current Opinion in Toxicology**, v. 22, p. 7-11, 2020.

PEREIRA, N.C.; DINIZ, T.O.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.. Sublethal effects of neonicotinoids in bees: a review. **Scientific Electronic Archives**, v. 13, n. 7, p. 142-152, 2020.

PERUGINI, M.; MANERA, M.; GROTA, M.; et al.. Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. **Biological Trace Element Research**, v. 140, n. 2, p. 170-176, 2011.

- PIGNATI, W.A.; LIMA, F.A.N.S.; LAA, S.S.; et al.. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.
- PIOVESAN, B.; PADILHA, A.C.; MORAIS, M.C.; et al.. Effects of insecticides used in strawberries on stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca fiebrigi* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 34, p. 42472-42480, 2020.
- PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; et al.. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: are there cases of CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.422-442, 2016.
- PLUTINO, M.; BIANCHETTO, E.; DURAZZO, A.; et al.. Rethinking the Connections between Ecosystem Services, Pollinators, Pollution, and Health: Focus on Air Pollution and Its Impacts. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 5, p. 2997, 2022.
- PORRINI, C.; MUTINELLI, F.; BORTOLOTTI, F.; et al.. The status of honey bee health in Italy: results from the nationwide bee monitoring network. **PloS One**, v. 11, n.5, e0155411, 2016.
- PORRINI, C.; SEBATINI, A.G.; GIROTTI, S.; et al.. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. **Apiacta**, v. 38, p. 63-70, 2003.
- POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.; NGO, H.T.; et al..Safeguarding pollinators and their values to human well-being. **Nature**, v. 540, n. 7632, p. 220-229, 2016.
- POTTS, S.G.; BIESMEIJER, J.C.; KREMEN, C. et al.. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 6, p. 345-353, 2010.
- RAMÓN-SIERRA, J. M.; RUIZ-RUIZ, J. C.; DE LA LUZ ORTIZ-VÁZQUEZ, E.. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 183, p. 43-48, 2015
- RAMOS, J.S.A.; PEDROSO, T.M.A.; GODOY, F.R.; et al.. Multi-biomarker responses to pesticides in an agricultural population from Central Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 754, p. 141-893, 2021.
- RIAZ, J.; RAZZAQ, H.; AMJAD, T.; ANJUM, A.; et al.. Pollution and pollinators: A review. **Pure and Applied Biology (PAB)**, v. 9, n. 3, p. 2049-2058, 2020.
- ROUBIK, D.W.. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 124-143, 2006.
- RUSSELL, S.; BARRON, A.B.; HARRIS, D.. Dynamic modelling of honey bee (*Apis mellifera*) colony growth and failure. **Ecological Modelling**, v. 265, p. 158-169, 2013.
- RYALLS, J.M.W.; LANGFORD, B.; MULLINGER, N.J.; et al.. Anthropogenic air pollutants reduce insect-mediated pollination services. **Environmental Pollution**, v. 297, p. 118847, 2022.
- SANTANA, S. L.; VERÇOSA, C. J.; CASTRO, I. F. A.; et al.. *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 32409-32417, 2018.
- SATA, A.; VERDINELLI, M.; RUIU, L.; et al.. Combination of beehive matrices analysis and ant biodiversity to study heavy metal pollution impact in a post-mining area (Sardinia, Italy). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 9, p. 3977-3988, 2012.

- SCHNEIDER, C.W.; TAUTZ, J.; GRUNEWALD, B.; FUCHS, S.. RFID tracking of sublethal effects of two neonicotinoid insecticides on the foraging behavior of *Apis mellifera*. **PloS One**, v. 7, n. 1, p. e 30023, 2012.
- SCHRAUFNAGEL, D.E.. The health effects of ultrafine particles. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 52, n. 3, p. 311-317, 2020.
- SEGRS, F. HID.; MENEZS, C.; VOLLAT-NETO.; et al.. Soldier production in a stingless bee depends on rearing location and nurse behaviour. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 69, n. 4, p. 613-623, 2015.
- SHAFFER, T. J.; MEYER, D. A.; CROFTON, K. M..Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: critical review and future research needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 2, p. 123+, 2005.
- SHARMA, K. R.; ENZMANN, B.L.; SCHMIDT, Y.; et al.. Cuticular hydrocarbon pheromones for social behavior and their coding in the ant antenna. **Cell Reports**, v. 12, n. 8, p. 1261-1271, 2015.
- SILVA, M.G.. Avaliação da genotoxicidade em *apis mellifera* expostas à poluição urbana e pesticida. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Pernambuco. p. 94, 2021.
- SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUMCES, L.P.; et al.. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5-34, 2015.
- SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.; SCHNEIDER, E.. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SLAA, E. J.; CHAVEZ, L. A. S.; MALAGODI-BRAGA, K. S.; HOFSTEDE, F. F. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, n. 2, p. 293-315, 2006.
- SOLTANI, N.; KESHAVARZI, B.; SOROOSHIAN, A.; et al.. Oxidative potential (OP) and mineralogy of iron ore particulate matter at the Gol-E-Gohar Mining and Industrial Facility (Iran). **Environmental geochemistry and health**, v. 40, p. 1785-1802, 2018.
- SZCZUREK, A.; MACIEJEWSKA, M.; BAK, B.; et al..Detecting varroosis using a gas sensor system as a way to face the environmental threat. **Science of the Total Environment**, v. 722, p. 137866, 2020.
- TCHOUNWOU, P. B.; YEDJOU, C.G.; PATLOLLA, A.K.; SUTTON, D.J.. Heavy metal toxicity and the environment. **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Environmental Toxicology**, v. 3, p. 133-164, 2012.
- TENKOUANO, G-T.; CUMMING, B. F.; JAMIESON, H. E. Geochemical and ecological changes within Moira Lake (Ontario, Canada): A legacy of industrial contamination and remediation. **Environmental Pollution**, v. 247, p. 980-988, 2019
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; et al.. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.
- TILMAN, D.; BALZER, C.; HILL, J.; BEFORT, B. L.. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011.

- TOSI, S.; DÈMARES, F.J.; NICOLSON, S.W.; et al.. Effects of a neonicotinoid pesticide on thermoregulation of African honey bees (*Apis mellifera scutellata*). **Journal of Insect Physiology**, v. 93, p. 56-63, 2016.
- UEDA, M.. Alkali comet assay in genotoxicity tests. In: **DNA Electrophoresis**. Humana, New York, NY, p. 73-78, 2020.
- ULLAH, S.; ZUBERI, A.; ALAGAWANY, M.; et al.. Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: Its prevention and control measure adaptation. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 863-871, 2018.
- VAN ZWEDEN, J.S.; D'ETTORRE, P.. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry and Chemical Ecology**, v. 11, p. 222-243, 2010.
- VANENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; et al.. Colony collapse disorder: a descriptive study. **PloS One**, v. 4, n. 8, p. 64-81, 2009.
- VENTURIERI, G.C.. **Criação de abelhas Indígenas sem ferrão**. 2ª ed. Embrapa, Belém-PA: 2008.
- VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. (edd.). **Pot-honey: a legacy of stingless bees**. Springer, New York, NY., Disponível em <<https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-4960-7>>, 2013.
- VOSSLER, F.G., BLETTLER, D.C., FAGÚNDEZ, G.A., DALMAZZO, M. Stingless bees as potential pollinators in agroecosystems in argentina: inferences from Pot-Pollen Studies in natural environments. In: Vit, P., Pedro, S., Roubik, D. (eds) **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Springer, Cham. Disponível em <https://doi.org/10.1007/978-3-319-61839-5_12> 2018.
- WILLIAMS, R.M.. Health Risks & Environmental Issues: Colony Collapse Disorder. **Townsend Letter, the Examiner of Alternative Medicine Magazine**, v. 299, p. 48-51, Disponível em < <https://www.townsendletter.com/June2008/healthrisk0608.htm>>, 2008.
- WILLIAMSON, S. M.; WRIGHT, G. A.. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 10, p. 1799-1807, 2013.
- 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.
- WU, J.Y.; ANELLI, C.M.; SHEPPARD, W.S. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e14720, 2011.
- YOUNG, P.J.; ARCHIBALD, A.T.; BOWMAN, K.W.; et al.. Pre-industrial to end 21st century projections of tropospheric ozone from the Atmospheric Chemistry and Climate Model Intercomparison Project (ACCMIP). **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 13, n. 4, p. 2063-2090, 2013.
- YU, H.; REMER, L.A.; CHIN, M.; et al.. Aerosols from overseas rival domestic emissions over North America. **Science**, v. 337, n. 6094, p. 566-569, 2012.