

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - *campus* SOROCABA  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE  
BIOLOGIA



ISABELLE CHRISTINE CORRÊA DE ARAÚJO

ANÁLISE DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO DE PIRETRO  
ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS NO INTESTINO DE  
*Tetragonisca angustula*

SOROCABA – SP

2021

ISABELLE CHRISTINE CORRÊA DE ARAÚJO

ANÁLISE DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO DE PIRETRO  
ENCAPSULADO EM NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS NO INTESTINO DE  
*Tetragonisca angustula*

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Departamento de  
Biologia da Universidade Federal de  
São Carlos Campus Sorocaba -  
UFSCar como parte dos Requisitos  
para obtenção do Título de Bacharel  
em Biologia, sob Orientação da Prof<sup>a</sup>.  
Dr<sup>a</sup>. Elaine Cristina Mathias da Silva  
Zacarin e Co-orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Cristiane Ronchi de Oliveira.

Sorocaba - SP

2021

## FICHA CATALOGRÁFICA

Araújo, Isabelle Christine Corrêa de

Análise do potencial citotóxico do extrato de piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas no intestino de *Tetragonisca angustula* / Isabelle Christine Corrêa de Araújo -- 2021.  
59f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin  
Banca Examinadora: Caio Eduardo da Costa Domingues, Pâmela Decio  
Bibliografia

1. Biomarcadores. 2. Ecotoxicologia. 3. Nanotecnologia.  
I. Araújo, Isabelle Christine Corrêa de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -  
CRB/8 6979

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Isabelle Christine Corrêa de Araújo

“Análise do potencial citotóxico do extrato de piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas no intestino de *Tetragonisca angustula*”

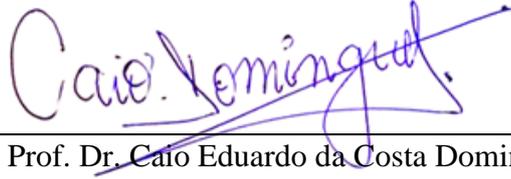
Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – Campus Sorocaba

Sorocaba, 22 de novembro de 2021.

Orientadora Elaine C. M. Silva Zacarin  
Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Coorientadora:   
Profa. Dra. Cristiane Ronchi de Oliveira

Membro 1   
Prof. Dr. Caio Eduardo da Costa Domingues

Membro 2 Pâmela Decio  
Dra. Pâmela Decio

Dedico a minha família e amigos.

É por vocês.

## **AGRADECIMENTO**

Os meus mais sinceros agradecimentos, de todo meu coração, a/aos...

... Meus pais, que sacrificaram parte de suas jornadas para que eu pudesse ter o que eles não tiveram. Reconheço todo o esforço de vocês e sou grata por isso. Obrigada por me sustentarem e me fornecerem subsídio para que eu concluísse essa graduação. Amo vocês.

... Meu irmão, Thiago Ismael (Cacá), que foi o primeiro a me estender a mão quando eu mais precisava. Você faz parte da minha base.

... Minha família, por sempre me respeitar nas minhas escolhas e demonstrarem orgulho sobre o que eu faço.

... UFSCar, esse espaço que nem sempre foi tão acolhedor, mas que ainda sim foi minha casa por quatro anos e me permitiu conhecer pessoas e ter experiências que jamais imaginei, além de ter contribuído muito para o meu processo de autoconhecimento. Aproveito para agradecer aos professores e funcionários da universidade, por muitas vezes terem transformado esse espaço positivamente.

... Núcleo de Pesquisa e Conservação de Abelhas (Nupeca): Josimere, Hellen, Caio, Pâmela, e, em especial, Cristiane e Rafaela, por me ajudarem muito, tanto nos projetos científicos como emocionalmente. Sou muito grata a todo aprendizado e tenho carinho eterno por vocês.

... Minha orientadora Elaine Cristina, que sempre esteve disponível para me ajudar e orientar na ciência, além de ser um ombro amigo nos momentos difíceis.

... Meus amigos, inicialmente ufscarianos, mas que se tornaram amigos de vida: Bárbara, Fernanda, Isis, João Victor Cassiel, João Victor Mendonça, João Victor Oliveira, Raissa e Agatha. Obrigada pelo apoio, carinho e lembranças, e espero que ainda tenhamos muitos momentos juntos.

... Meus amigos de fora da universidade, mas que foram igualmente importantes nessa jornada.

... A todos que, de forma direta ou indireta, tornaram meu caminho um pouco mais colorido até aqui.

## RESUMO

As abelhas estão expostas a uma ampla diversidade de agrotóxicos durante a atividade de forrageamento, como por exemplo os piretróides, um grupo químico de agrotóxicos neurotóxicos que afetam as abelhas ao causar prejuízos à saúde e diminuição da sobrevivência dos indivíduos. Apesar dos estudos ecotoxicológicos se concentrarem na espécie modelo *Apis mellifera*, as abelhas nativas também estão expostas aos agrotóxicos e ainda apresentam uma sensibilidade diferente a essas substâncias químicas, como a espécie *Tetragonisca angustula*, uma abelha nativa sem ferrão que tem grande relevância na polinização de ecossistemas naturais. Nesse sentido, alternativas para os efeitos nocivos de agrotóxicos nas abelhas podem estar no uso de inseticidas botânicos e de nanopesticidas. Dessa forma, esse estudo teve por objetivo o diagnóstico dos efeitos citotóxicos do inseticida botânico extrato de piretro no intestino médio de *T. angustula* e sua comparação com o inseticida encapsulado em nanopartícula lipídica sólida e isolada e com a formulação comercial deltametrina. Para isso, operárias de *T. angustula* foram coletadas na entrada de suas colônias e submetidas a bioensaio de exposição oral, sendo ensaiados sete grupos experimentais em triplicata: Controle, Controle acetona, Extrato de piretro puro, Piretro carregado em nanopartícula, Nanopartícula isolada, Acetato de polivinila e Deltametrina. Após 48 horas de exposição contínua, as abelhas foram submetidas a dissecação para remoção dos intestinos, que foram processados para microtomia e posterior análise histológica. As lâminas contendo as seções histológicas de cada indivíduo foram coradas com Hematoxilina e Eosina e analisadas para diagnóstico das alterações histológicas no intestino médio. Os resultados semiquantitativos indicam que o extrato de piretro foi menos citotóxico que a deltametrina, porém não apresentou diferença significativa com o piretro encapsulado na nanopartícula. Conclui-se que o inseticida botânico puro e nanoencapsulado pode representar uma alternativa mais segura para as abelhas em comparação aos agrotóxicos sintéticos.

**Palavras-chaves:** abelha nativa, efeitos subletais, inseticida botânico, intestino médio, Meliponini

## ABSTRACT

Bees are exposed to a wide variety of pesticides during a foraging activity, such as pyrethroids, a chemical group of neurotoxic pesticides that affect like bees by causing damage to health and reducing the deficiency of disorders. Although ecotoxicological studies focus on the model species *Apis mellifera*, as native bees they are also exposed to pesticides and still have a different sensitivity to these substances, such as a species *Tetragonisca angustula*, a native stingless bee that has great potential for pollination of natural systems. In this sense, alternatives for the harmful effects of pesticides on bees can be found in the use of botanical insecticides and nanopesticides. Thus, this study aimed to diagnose the cytotoxic effects of the botanical insecticide pyrethrum extract on the midgut of *T. angustula* and its comparison with the insecticide encapsulated in solid and complete lipid nanoparticle and with the additional commercial deltamethrin. For this, workers of *T. angustula* were collected at the entrance of their colonies and submitted to oral exposure bioassay, being tested seven experimental groups in triplicate: Control, Acetone Control, Pure pyrethrum extract, Pyrethrum carried in nanoparticle, Isolated nanoparticle, Acetate of polyvinyl and Deltamethrin. After 48 hours of continuous exposure, the bees were subjected to dissection to remove the intestines, which were processed for microtomy and subsequent histological analysis. The slides containing the histological sections of each individual were stained with Hematoxylin and Eosin and analyzed for diagnosis of histological changes in the midgut. The semiquantitative results indicate that the pyrethrum extract was less cytotoxic than deltamethrin, but it did not differ with the pyrethrum encapsulated in the nanoparticle. It is concluded that the pure and nanoencapsulated botanical insecticide may represent a safer alternative for bees compared to synthetic pesticides.

Keywords: stingless bee, sublethal effects, botanical insecticide, midgut, Meliponini

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	10
<b>1.2 Fundamentação teórica</b> .....	12
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	20
<b>2.1 Objetivos específicos</b> .....	20
<b>3 ARTIGO</b> .....	21
<b>Resumo</b> .....	21
<b>3.1 Introdução</b> .....	21
<b>3.2 Materiais e métodos</b> .....	23
3.2.1 Obtenção do agrotóxico e nanopartícula.....	23
3.2.2 Bioensaio com <i>Tetragonisca angustula</i> .....	24
3.2.3 Análise histológica.....	25
3.2.4 Análise semiquantitativa do intestino médio.....	25
3.2.5 Análise estatística.....	26
<b>3.3 Resultados e Discussão</b> .....	27
<b>3.4 Conclusões</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	59

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Devido ao seu amplo uso nas culturas agrícolas existentes no mundo, assim como relatos de mortalidade em diferentes espécies (REF), os agrotóxicos são xenobióticos (substâncias químicas estranhas ao organismo) importantes de serem estudados pela área da Ecotoxicologia. Atualmente, o agronegócio é um importante ramo econômico em diversos países, sendo responsável por 26,9% do Produto Interno Bruto do Brasil (CEPEA/CNA, 2021). Arelado a essa importância, os agrotóxicos são usados em larga escala para extermínio de pragas agrícolas e aumento na produtividade das lavouras (CARNEIRO et al., 2015). No entanto, eles podem ser tóxicos para organismos não-alvos, como as abelhas, que são essenciais para a boa qualidade das próprias culturas. Por isso, é importante que seus efeitos sejam estudados pela área da Ecotoxicologia.

As abelhas são importantes polinizadores de plantas cultiváveis e não cultiváveis, contribuindo com a diversidade genética das espécies e melhorando a qualidade dos frutos (GARIBALDI et al., 2011; KLEIN et al., 2007). No Brasil, são encontradas aproximadamente 244 espécies descritas de abelhas nativas sem ferrão (PEDRO, 2014), e elas são responsáveis por aproximadamente 40–90% da polinização da vegetação nativa, dependendo do ecossistema considerado (KERR et al., 1997; LOPES; FERREIRA; SANTOS, 2005; PEDRO, 2014). Dentre a diversidade de espécies existentes, a espécie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) é muito comum em ambientes urbanos e presente em todas regiões do país (CORTOPASSI-LAURINO, 2005; LOPES; FERREIRA; SANTOS, 2005), esta poliniza algumas espécies de plantas das famílias Nyctaginaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, Fabaceae, Bignoniaceae, Apiaceae, Asteraceae, entre outras (RCPOL, 2016).

Além disso, as abelhas sem ferrão podem estar sofrendo uma redução populacional, a qual é um fenômeno global inicialmente percebido nos Estados Unidos e posteriormente na Europa, e relatado principalmente com a espécie *A. mellifera*. Contudo, outras espécies de abelhas também estão expostas aos mesmos fatores extressores (PIRES et al., 2016; SANTOS, 2010). Doenças causadas por microsporídios, vírus e ácaros, mudanças climáticas, perda de hábitat, desnutrição pela falta de variedade de recursos e exposição a agrotóxicos são fatores que levam à diminuição na sobrevivência das abelhas (GOULSON et al., 2015). Considerando a grande diversidade de espécies de abelhas no país com diferentes fisiologias,

comportamentos, e graus de sociabilidade, bem como a diferença de sensibilidade aos agentes estressores no ambiente como evidenciado por estudos toxicológicos com agrotóxicos (CHAM et al., 2019; MIOTELO et al., 2021; ROSA-FONTANA et al., 2020), é reconhecido que as medidas de proteção e avaliação de risco baseados no modelo *A. mellifera* podem não ser suficientes para proteger as demais espécies de abelhas sociais e solitárias nativas (FISHER, 2021; SCHMOLKE et al., 2021; SGOLASTRA et al., 2020).

Dentre os agrotóxicos relacionados à redução das populações de abelhas, estão os piretróides (BOVI, 2013), um grupo químico de inseticidas sintéticos formulados com base nas piretrinas (HIRATA, 1995). Esses inseticidas são amplamente usados na agricultura, a exemplo da bifentrina, deltametrina, permetrina, lambda-cialotrina, entre outros. Os piretróides têm efeitos prejudiciais às abelhas, conforme estudos realizados com *A. mellifera*, diminuindo seu tempo de sobrevivência (JOHNSON et al., 2010) e causando alterações comportamentais (FREITAS; PINHEIRO, 2010) e citotóxicas no intestino médio (ALJEDANI; SHIBOUB; ALMEHMADI, 2017), cérebro, hipofaringe e glândulas (CASTRO et al., 2020). Além disso, podem se acumular nas lavouras após repetidas aplicações, e permanecer no ambiente por meses, como por exemplo, no pólen (CABRAS et al., 1985; ERICKSON; ERICKSON, 1983; SANTOS, 2005), dessa forma, a busca por alternativas mais segura aos organismos não-alvos é imprescindível.

Uma possível solução são os inseticidas botânicos, que são substâncias biossintetizadas pelo metabolismo secundário de plantas e que apresentam função de repelência ou intoxicação de predadores, como os insetos fitófagos (AGUIAR-MENEZES, 2005). Conhecido desde 1800, o extrato de piretro é um composto extraído das flores da espécie *Chrysanthemum cinerariae folium* e que tem função inseticida com ação neurotóxica, sendo amplamente usado para o controle de moscas, pulgas, mariposas, formigas e mosquitos (BOND; BUHL; STONE, 2014; VISHAL-SONI, 2014). Estudos vêm sendo realizados a fim de diagnosticar seus efeitos em organismos não-alvos (OLIVEIRA et al., 2019a; OLIVEIRA et al., 2019b), visto que os inseticidas botânicos têm potencial de serem menos tóxicos a esses organismos (AGUIAR-MENEZES, 2005).

Outra possível solução para diminuir os prejuízos causados pelos agrotóxicos pode estar relacionado com a utilização da nanotecnologia. Os nanopesticidas são

produzidos pelo encapsulamento do princípio ativo de um agrotóxico em nanopartículas, buscando uma menor toxicidade aos organismos não-alvos e menor poluição no ambiente, como em solos e corpos hídricos, devido sua lenta velocidade de liberação (BOSE, 2021; HELGASON et al., 2009). As nanopartículas lipídicas sólidas ainda apresentam a vantagem de serem menos passíveis à degradação química, além de conseguirem atingir locais específicos em organismos-alvos devido sua matriz lipídica (BOSE, 2021; HELGASON et al., 2009). Embora tenham potencial menos tóxico, estudos ainda são necessários para comprovar esses efeitos na biota terrestre e aquática, visto que podem ser considerados contaminantes emergentes (ROCHA; BARBOSA JÚNIOR, 2014; TORDIN, 2018).

Considerando essas possíveis soluções nanotecnológicas descritas na literatura e baseado em dados prévios (OLIVEIRA et al., 2019) obtidos para a espécie exótica *Apis mellifera* Africanizada, a hipótese deste estudo é que a toxicidade do piretro ao epitélio intestinal da espécie nativa de abelha sem ferrão *T. angustula*, exposta por meio de ingestão oral, diminui quando o piretro é carregado por nanopartículas lipídicas sólidas, em comparação ao piretro em formulação comercial e extrato de piretro isolado, se constituindo assim, como uma alternativa ao uso convencional de agrotóxicos em culturas visitadas por polinizadores.

## 1.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

No mundo existem mais de 190 milhões de substâncias químicas registradas segundo a *American Chemical Society* (CAS), sendo que, desse total, 85 mil estão listadas como substâncias tóxicas na *Environmental Protection Agency* (EPA). No entanto, é difícil saber e estimar quantos produtos estão em uso atualmente pela sociedade, o que levanta a discussão de quantos compostos tóxicos podem estar em contato com os seres humanos e com a biodiversidade (UNEP, 2020).

Com foco no estudo de potenciais efeitos das substâncias químicas nos seres vivos, a Ecotoxicologia, considerada um ramo da Toxicologia Ambiental, se especifica no estudo de como esses agentes químicos interferem na dinâmica populacional dentro de um ecossistema, seja com pesquisa *in situ* ou em laboratório, utilizando de organismos autóctones ou espécies modelo (ABE, 2017; NIVA; BROWN, 2019). O termo mais usual nos estudos ecotoxicológicos são xenobióticos, definidos como substâncias químicas estranhas aos seres vivos e que podem ser produzidos

naturalmente por processos biológicos, como por exemplo alguns compostos vegetais (ex.: ópio, cicuta, etc.); por fenômenos naturais (ex: erupções vulcânicas); ou podem ser sintéticos, produzidos antropicamente, em especial pelas indústrias (ex.: agrotóxicos, fármacos, etc.) (PATTERSON; GONZALEZ; IDLE, 2010). Os xenobióticos não são necessariamente prejudiciais ao indivíduo, no entanto, o risco ecológico de um xenobiótico pode ser influenciada por dois fatores: quantidade ou concentração do xenobiótico e tempo e/ou frequência de exposição (ISSX, 2021).

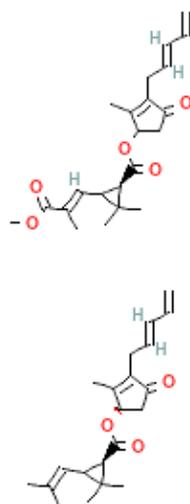
Vários estudos relatam a toxicidade dos xenobióticos sintéticos em diferentes seres vivos não-alvos, como as abelhas (por exemplo, DOMINGUES et al, 2020; OLIVEIRA et al., 2013; TADEI et al., 2020; TISON et al., 2019), diplópodes (MOSCARDI; SOUZA; FIGUEIREDO, 2018), colêmbolos (MENEZES-OLIVEIRA et al., 2018), anfíbios (FIGUEIREDO; RODRIGUES, 2014; JONES-COSTA et al., 2018), peixes (OLSVIK et al.; 2019; SABRA; MEHANA, 2015), mamíferos (MEDICI et al., 2021; SULTATOS, 1994), aves (ARYA; SINGH, BHATT, 2019; STICKEL, 1973), entre outros. Nesses estudos, são observados diferentes efeitos nos espécimes, como: citotóxicos (TADEI et al., 2020; MEDICI et al., 2021), genotóxicos (LI et al., 2019; OLSVIK et al., 2019), hematológicos (MITRA; CHATTERJEE; MANDAL, 2011), comportamentais (GRUE; GIBERT; SEELEY, 1997; MITRA; CHATTERJEE; MANDAL, 2011; TADEI et al., 2020), além de diminuição da sobrevivência (FREITAS; PINHEIRO, 2010; HENRY et al., 2012; TADEI et al., 2020) e outros efeitos metabólicos, neurológicos e bioquímicos (ARYA; SINGH, BHATT, 2019; FREITAS; PINHEIRO, 2010; GRUE; GIBERT; SEELEY, 1997; PEREIRA et al., 2018).

O Brasil está entre os dez maiores produtores agrícolas do mundo, ocupando a quarta posição na produção de grãos e sendo o segundo maior exportador agropecuário do mundo (ARAGÃO; CONTINI, 2021). Sendo assim, a agricultura representa um importante ramo econômico no país. Em 2020, o agronegócio contribuiu em dois trilhões em Produto Interno Bruto (PIB) (26,9% do PIB) e representou 30% das exportações em 2019 (ABRASCO, 2021; CEPEA/CNA, 2021). Por outro lado, em conjunto com o crescimento da agroeconomia, o uso de agrotóxicos no Brasil também aumentou. A partir de 1900, a quantidade de agrotóxicos usados nas lavouras passou de 58 mil toneladas a 375 mil toneladas em 2015, significando 9,2% em relação ao percentual global (MORAES, 2019), e, em 2008, o Brasil atingiu o primeiro lugar no mercado de agrotóxicos (CARNEIRO et al.,

2015). Esse aumento está relacionado à expansão do plantio de organismos transgênicos em monoculturas, como a soja, e também a uma maior resistência das pragas como, por exemplo, ervas daninhas, fungos e insetos (CARNEIRO et al., 2015). Dessa forma, estudos para identificar os impactos do uso de agrotóxicos em nível de espécie, de população e de ecossistema tornaram-se importantes e necessários, em especial em um país no qual o registro de formulações de agrotóxicos atingiu recorde histórico em 2020 (NUNES et al., 2021).

A busca por novas formulações menos tóxicas aos seres vivos e ao meio ambiente vem sendo intensificada em pesquisa e desenvolvimento científicos, e os inseticidas botânicos representam uma possível solução. Diversas espécies de plantas produzem substâncias químicas secundárias nas suas rotas biossintéticas metabólicas, que aumentam a chance de sobrevivência do organismo vegetal ao repelir ou intoxicar animais herbívoros, em especial insetos fitófagos (AGUIAR-MENEZES, 2005). O piretro é um exemplo de inseticida botânico, sendo um composto formado principalmente por piretrinas (piretrina I e piretrina II), extraídas da flor da espécie *Chrysanthemum cinerariae folium*, e por outros compostos adicionais que aumentam sua eficiência como agrotóxico (VISHAL SONI, 2014). As piretrinas são formadas por seis ésteres dos ácidos crisantêmicos e pirétricos com os álcoois ciclopentonas (piretrolona, cinerolona e jasmolona) (Figura 1). Desde 1800, o composto piretro é geralmente usado como inseticida contra pulgas, moscas, mariposas, formigas e mosquitos (AGUIAR-MENEZES, 2005; BOND; BUHL; STONE, 2014). Uma das substâncias químicas produzidas sinteticamente baseada nas piretrinas é conhecida como piretróide (HIRATA, 1995).

Figura 1. Representação 2D da Piretrina I (superior) e Piretrina II (inferior).



Fonte: NCBI/PubChem (2013).

No Brasil, os piretróides são amplamente usados em culturas de grãos, como milho, sorgo e soja, mas alguns inseticidas desse grupo também podem ser aplicados em outras culturas, como na alface, algodão e solanáceas. No entanto, segundo estudo, algumas amostras de alimentos apresentaram piretróides em concentrações acima do limite máximo de resíduos (LMR) permitido, tendo como exemplo o tomate, o qual apresentou resíduos de permetrina e cipermetrina até sessenta vezes acima do permitido pela legislação (SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Além disso, também foi identificado o uso de piretróides em culturas onde o uso desse inseticida não é permitido, como por exemplo a goiaba (ANVISA, 2019), que apresentou resultados positivos para 10,60% das amostras analisadas para detectar a presença de cipermetrina (FRIEDRICH et al., 2021).

O extrato de piretro (natural) e o piretróide (sintético) têm efeito sistêmico nos insetos, sendo eficazes no controle desses organismos-alvos tanto por via oral como por contato (FIELD et al., 2017). A principal via de atuação desses compostos químicos são as proteínas do sistema nervoso, em especial os canais de sódio dependentes de voltagem presentes na membrana do axônio do neurônio. As substâncias em questão impedem o fechamento desses canais, permitindo a contínua entrada de sódio no axônio, resultando na hiperpolarização da membrana celular, causando hiperexcitação, seguido de paralisia e morte no inseto (FIELD et al., 2017).

As piretrinas do extrato de piretro se decompõem rapidamente na presença de luz solar, apresentando meia-vida de 11,8 horas na água e 12,9 horas no solo (BOND; BUHL; STONE, 2014; VISHAL SONI, 2016). Nas formulações de piretróides sintéticos, no entanto, são adicionadas substâncias químicas que aumentam sua estabilidade e atividade biológica, ampliando efetivamente o tempo em que o composto permanece no ambiente, como no solo e nas plantas (HIRATA, 1995).

Os piretróides sintéticos são considerados altamente tóxicos para as abelhas (CASTRO et al., 2020; JOHNSON et al., 2010; TOYNTON et al., 2009) e podem estar presente no pólen, possibilitando o contato dos indivíduos com os resíduos de agrotóxicos durante o forrageamento. Um estudo realizado no Brasil encontrou resíduos de deltametrina, ciflutrina, permetrina e cipermetrina em amostras de pólen de todas regiões no país. As regiões com maior quantidade de resíduos foram: Sudeste (deltametrina e cipermetrina), Sul (ciflutrina) e Norte (permetrina) (SANTOS, 2005). Além disso, outros estudos também relatam a longa permanência de piretróides no pólen, bem como o acúmulo desses compostos nas culturas agrícolas após várias aplicações (CABRAS et al., 1985; ERICKSON; ERICKSON, 1983; SANTOS, 2005). O néctar também pode ser contaminado por resíduos de piretróides, como relatado na própria bula do inseticida sulfaxaflor + lambda-cialotrina (CORTEVA, 2019). Adicionando esses fatores à diminuição populacional das abelhas, a preocupação quanto ao uso desse inseticida em agroecossistemas é despertada.

As abelhas são consideradas importantes polinizadoras de plantas nativas e cultivadas. Os serviços de polinização desempenhados pelas abelhas são essenciais para a melhoria da qualidade dos frutos e para manutenção da diversidade genética das plantas visitadas por elas (GARIBALDI et al., 2011). A polinização influencia positivamente 75% das culturas agrícolas globais, e o faturamento mundial ligado diretamente à polinização está entre 235 e 577 bilhões de dólares ao ano (FAO, 2021). Dessa forma, a polinização realizada por abelhas é considerada um serviço ecossistêmico de regulação, ou seja, é responsável por manter o equilíbrio das condições ambientais de maneira natural, beneficiando também os seres humanos (KLEIN et al., 2007; MEA, 2005).

Devido a importância das abelhas para a polinização, existe a preocupação com o declínio de suas populações, causado por fatores como a fragmentação de habitats (POTTS et al., 2011), mudanças climáticas (GIANNINI et al., 2017), o uso

indiscriminado de agrotóxicos sistêmicos que contaminam o néctar e o pólen nos cultivos agrícolas e no entorno (por deriva em caso de pulverização) (GOULSON et al., 2015), a pobreza nutricional (recursos monoflorais) (POTTS et al., 2011) e as doenças (causadas por vírus, ácaros ou microsporídios) (PIRES et al., 2016), consequentemente levando a diminuição da imunidade da colônia e dos seus indivíduos.

A abelha *Apis mellifera* é a espécie eussocial mais comumente utilizada para o processo de polinização agrícola, devido ao ciclo de vida mais rápido e adaptação a áreas abertas (OLIVEIRA; CUNHA, 2005). No entanto, algumas culturas agrícolas são melhores polinizadas por abelhas sociais nativas, com tamanho corporal mais compatível com o tamanho das flores ou que apresente um comportamento de forrageamento mais eficaz ao tipo de processo de liberação do pólen (PEDRO, 2014). Por isso, as abelhas sem ferrão também apresentam importância econômica na produção agrícola (SLAA et al., 2006). Cerca de 30% de espécies de fanerógamas da Caatinga e do Pantanal, bem como 90% de fanerógamas dos fragmentos de Mata Atlântica, são polinizadas essencialmente por abelhas sem ferrão (KERR, 1997). Outros biomas, como Cerrado e Pampas, também apresentam grande diversidade de espécies de abelhas sem ferrão (PEDRO, 2014; RÊGO; ALBUQUERQUE, 2009; VENTURIERI et al., 2012; WITTER, 2009).

Diferente da espécie poli-híbrida exótica *A. mellifera* Africanizada, as abelhas sem ferrão, também chamadas de meliponídeos, possuem ferrão atrofiado sem função de defesa (LOPES; FERREIRA; SANTOS, 2005). A maioria quase absoluta das espécies tem hábito tipicamente eussocial, podem ter de 2 a 15 mm de comprimento, e apresentam hábitos variados de nidificação e de forrageamento (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002). A espécie de abelha sem ferrão *T. angustula*, popularmente nomeada de jataí, é um exemplo de abelha sem ferrão de adaptação tanto no ambiente urbano como em agroecossistemas, e está distribuída em diversos estados brasileiros: São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Pernambuco, Paraná, Rondônia, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CORTOPASSI-LAURINO, 2005; LOPES; FERREIRA; SANTOS, 2005; SANTOS, 2010). Como as abelhas sociais nativas que visitam culturas agrícolas e as áreas ao entorno estão expostas aos agrotóxicos e podem apresentar sensibilidade diferente a essas

substâncias quando comparadas a *A. mellifera* (CHAM et al., 2019; MIOTELO et al., 2021; ROSA-FONTANA et al., 2020), manifesta-se a necessidade de estudos para criação de medidas que protejam essas espécies.

Diante do crescente aumento da meliponicultura em agroecossistemas, uma possível solução para a problemática envolvendo agrotóxicos e seus impactos ambientais, incluindo seus efeitos negativos em insetos não-alvos, está na nanotecnologia. A nanotecnologia é um ramo da ciência que permite a manipulação de propriedades da matéria em escala nanométrica, ou seja, em nível molecular e atômico (EMBRAPA, 2018). As nanopartículas lipídicas sólidas foram desenvolvidas com o objetivo de carrear lipídios bioativos e compostos químicos de interesse, em especial fármacos, de maneira a facilitar que o ingrediente ativo ultrapasse barreiras celulares lipídicas e atinja locais específicos no organismo em que a substância foi inserida (VILLAFUERTE et al., 2008; YOON; PARK; YOON, 2013). Lipídios sólidos apresentam maior controle sobre a cinética de liberação do ingrediente ativo encapsulado, permitindo modular a velocidade de liberação do composto em comparação a nanopartículas lipídicas líquidas. Devido à matriz sólida, o ingrediente ativo é menos propenso à degradação química (HELGASON et al., 2009).

Posteriormente, as nanopartículas passaram a ser de interesse de outras áreas, como a agricultura (BAKER et al., 2017; KIM et al., 2017). Na última década, a nanotecnologia vem sendo empregada em grande escala na utilização de nanofertilizantes e nanopesticidas (GHIDAN; ANTARY, 2019; USMAN et al., 2020). Os nanopesticidas têm menor potencial de contaminação ambiental devido à lenta liberação do ingrediente ativo para o meio, uma vez que há aumento da solubilidade do composto encapsulado na nanopartícula, diminuindo sua mobilidade no solo e aumentando sua eficácia na planta. Portanto, os nanopesticidas apresentaram sucesso no controle dos organismos-alvos (BOSE, 2021) com potencial diminuição de risco de contaminação ambiental. Estudo realizado por Oliveira et al. (2019a) utilizando esse tipo de nanopartícula como carreador do inseticida botânico piretro demonstrou que os efeitos citotóxicos em abelhas *A. mellifera* foram menores em comparação ao extrato de piretro na sua forma livre, ou seja, sem encapsulamento. No entanto, os autores ressaltam a necessidade de mais estudos para entender o impacto das nanopartículas lipídicas sólidas isoladas no organismo estudado.

A compreensão dos efeitos de nanopartículas em organismos não-alvos pode ser alcançada por meio de biomarcadores em diferentes escalas biológicas, os quais são importantes ferramentas para mensurar o risco potencial de um agente físico, químico ou biológico em um organismo vivo e no ambiente, utilizando-se de marcações em nível molecular, bioquímico, celular/tecidual, fisiológico ou comportamental (GIL; PLA, 2001; TAYLOR, 2019). Marcadores histológicos, por exemplo, são muito úteis para caracterização de parâmetros toxicológicos e cancerígenos de um xenobiótico em organismos no geral (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). As abelhas são consideradas importantes organismos bioindicadores, pois estão amplamente distribuídas em regiões urbanas e rurais e permitem rastrear o uso de determinados xenobióticos por meio de análises moleculares e celulares, bem como de seus produtos, como o mel (TAYLOR, 2019).

Nos estudos ecotoxicológicos com abelhas, o intestino médio é um órgão amplamente utilizado no diagnóstico de efeitos celulares que os xenobióticos podem causar em nível histológico, pois o epitélio do intestino forma uma importante barreira física e química contra os compostos potencialmente tóxicos ingeridos na sua alimentação, provenientes da ingestão de néctar e/ou pólen contaminados (EL-SAAD; KHEIRALLAH; EL-SAMAD, 2017; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006). O sistema digestivo das abelhas é formado inicialmente pela faringe, seguido pelo esôfago. No abdômen da abelha existem o intestino anterior, intestino médio e intestino posterior, sendo o intestino médio o principal órgão metabólico do inseto, responsável pela digestão e absorção de nutrientes (SILVA-ZACARIN, 2011; SNODGRASS, 1910). Na extensão do intestino posterior, há filamentos conectados à parede intestinal, que são os túbulos de Malpighi com função de excreção nos insetos (BOMFIM; OLIVEIRA; FREITAS, 2017; NOCELLI et al., 2016).

Considerando que as abelhas são organismos de extrema importância tanto para a biodiversidade como para a economia agrícola e os riscos a que estão expostas devido ao uso de agrotóxicos sintéticos, uma possível solução a essa problemática pode estar na nanotecnologia e no uso de inseticidas botânicos, esse trabalho visa contribuir para a área de estudo da Ecotoxicologia ao avaliar os efeitos, em escala subindividual (biomarcadores celulares em nível histológico), do extrato de piretro encapsulado ou não em nanopartículas lipídicas sólidas no intestino médio da espécie de abelha nativa sem ferrão *T. angustula*.

## 2 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve por objetivo analisar o potencial citotóxico do extrato de piretro, encapsulado ou não em nanopartículas lipídicas sólidas, a partir da análise histológica do intestino médio de operárias de *T. angustula* expostas por via oral em condições laboratoriais.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Por meio da avaliação de biomarcadores celulares de citotoxicidade analisadas em nível histológico no intestino médio da abelha, objetiva-se:

- Diagnosticar os efeitos citotóxicos do extrato de piretro carregado ou não por nanopartícula lipídica sólida;
- Identificar se a nanopartícula isolada apresenta citotoxicidade ao epitélio intestinal;
- Analisar se o efeito do princípio ativo isolado (piretro) é semelhante ao princípio ativo com uma formulação comercial (deltametrina) quanto a citotoxicidade;
- Analisar se o piretro carregado por nanopartícula pode representar uma alternativa mais segura ao uso de agrotóxicos convencionais quanto a diminuição ou ausência de citotoxicidade no intestino da abelha.

## 3 ARTIGO

### **Análise do potencial citotóxico do extrato piretro encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas no intestino de *Tetragonisca angustula***

#### **RESUMO**

As abelhas estão expostas a uma ampla variedade de agrotóxicos, como os piretróides sintéticos, durante a atividade de forrageamento em agroecossistemas, causando prejuízos à saúde dos indivíduos. Os estudos ecotoxicológicos estão concentrados na espécie modelo *Apis mellifera*, porém há necessidade de se avaliar a resposta das abelhas nativas aos agrotóxicos, visto que podem apresentar uma sensibilidade diferente a eles. A abelha social sem ferrão jataí (*Tetragonisca angustula*, Latreille, 1811) é uma espécie com grande importância na polinização de plantas nativas e na meliponicultura. Soluções para essa problemática, portanto,

podem estar no uso de inseticidas botânicos e de nanopesticidas. Dessa forma, esse estudo teve por objetivo o diagnóstico dos efeitos citotóxicos no intestino médio de operárias de *T. angustula* do inseticida piretro em três diferentes formulações: I – extrato de piretro (puro), II – piretro encapsulado em nanopartícula lipídica sólida, III - formulação comercial do inseticida (deltametrina), além do comparativo com os grupos: controle, controle acetona, nanopartícula isolada e acetato de polivinila. Para isso, operárias de *T. angustula* foram coletadas durante atividade de voo e divididas em sete grupos experimentais em triplicata, os quais foram submetidos a bioensaio de exposição oral contínua durante 24 horas. Posteriormente, os indivíduos foram dissecados e os intestinos foram removidos, processados e submetidos a microtomia para análise histológica. As lâminas contendo as secções histológicas de cada indivíduo foram coradas com Hematoxilina e Eosina e analisadas para diagnóstico das alterações morfológicas no intestino médio. Sete alterações no intestino médio foram utilizadas como biomarcadores de citotoxicidade, sendo realizada análise semiquantitativa para cada lesão tecidual elencada. Os resultados indicam que o extrato de piretro foi menos citotóxico que a deltametrina, porém não apresentou diferença significativa entre o piretro isolado e o encapsulado na nanopartícula, indicando, portanto, que o inseticida botânico puro pode representar uma alternativa mais segura para as abelhas em comparação aos agrotóxicos sintéticos. Ainda que o inseticida nanoencapsulado também possa ser utilizado em lavouras devido à baixa citotoxicidade em abelhas, deve haver atenção quanto ao potencial de contaminação ambiental das nanopartículas isoladas.

**Palavras-chaves:** abelha nativa, análise histológica, inseticida botânico, intestino médio, Meliponini

**Revista científica a ser submetido:** Revista especializada na área de Ecotoxicologia.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Estudos ecotoxicológicos com espécies de abelhas sociais nativas, as abelhas sem ferrão, são extremamente importantes para a conservação, visto que essas espécies são essenciais na polinização de plantas nativas (KERR, 1997; LOPES; FERREIRA; SANTOS, 2005; PEDRO, 2014) e estão expostas a diversos estressores, como por exemplo: doenças causadas por microrganismos (TEIXEIRA et al., 2020), desnutrição causada por recursos monoflorais (GOULSON et al., 2015), mudanças

climáticas (GIANNINI et al., 2017) e exposição excessiva a agrotóxicos (FRANKLIN; RAINE, 2019). Apesar dos mesmos riscos que a espécie modelo para estudos ecotoxicológicos, a *Apis mellifera*, as abelhas nativas apresentam diferente sensibilidade a esses estressores, manifestando necessidade em se aprofundar nos efeitos de agrotóxicos usados na agricultura em abelhas sem ferrão, visto que esses estudos ainda são escassos considerando espécies nativas, dentre elas, a espécie *Tetragonisca angustula* (ARENA; SGOLASTRA, 2014; CHAM et al., 2019; DEL SARTO et al., 2014; FRANKLIN; RAINE, 2019; MIOTELO et al., 2021).

Devido a sua atividade de forrageamento, as abelhas estão expostas tanto por contato, quanto por via oral, a diversos resíduos de agrotóxicos que podem se acumular no pólen e no néctar durante a aplicação, os quais são coletados pelos indivíduos e levados até à colônia (JAFFE; LOIS; GUÉDOT, 2019; SAMARGHANDI et al., 2017; PETTIS et al., 2013). Os piretróides formam um grupo químico de agrotóxicos sintéticos neurotóxicos muito usados em culturas agrícolas ao redor do mundo, a exemplo da bifentrina, permetrina, deltametrina, entre outros (HIRATA, 1995; SANTOS; AREAS; REYES, 2007). Estudos demonstram que esses agrotóxicos podem causar efeitos deletérios nas abelhas, organismos não-alvos, como diminuição na sobrevivência (JOHNSON et al., 2010), alterações comportamentais (DECOURTYE et al., 2004) e citotoxicidade em diversos órgãos (ALJEDANI; SHIBOOB; ALMEHMADI, 2017; CASTRO et al., 2020).

Sabendo-se do risco que diversos agrotóxicos sintéticos podem causar em organismos não-alvos, algumas alternativas são estudadas para diminuir esses impactos. Os inseticidas botânicos são substâncias químicas biossintetizadas por meio do metabolismo secundário de algumas espécies de plantas, podendo ter efeito repelente ou intoxicante no inseto, apesar de ser menos tóxico a organismos não-alvos (AGUIAR-MENEZES, 2005). O extrato de piretro é um exemplo de inseticida botânico baseado nas piretrinas e retirado das flores da espécie *Chrysanthemum cinerariae folium* (BOND; BUHL; STONE, 2014; VISHAL SONI, 2014). Estudo realizado por Oliveira et al. (2019a) com objetivo de diagnosticar os efeitos citotóxicos do extrato de piretro encapsulado em nanopartícula em abelhas *A. mellifera* demonstrou que concentrações baixas de extrato de piretro puro apresentou atenuada citotoxicidade à espécie.

Adicionalmente, também visando diminuir os impactos negativos dos agrotóxicos em organismos não-alvos e no ambiente, os nanopesticidas se apresentam como uma possível solução a essa problemática (BAKER et al., 2017; KIM et al., 2017). Agrotóxicos encapsulados em nanopartículas, como o próprio piretro carregado por um tipo de nanopartícula (a nanopartícula lipídica sólida), vêm sendo estudados por meio de biomarcadores celulares para diagnóstico dos efeitos em animais não-alvos como as abelhas (OLIVEIRA et al., 2019a). Uma vez que o pólen e néctar contendo resíduos de agrotóxicos podem ser consumidos pelas abelhas, o sistema digestivo é o primeiro local de contato com essas substâncias. O intestino médio, em particular, é um importante órgão utilizado para avaliação dos efeitos desses resíduos, pois biomarcadores celulares/histológicos indicativos de citotoxicidade podem ser avaliados neste órgão (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006).

Considerando os riscos a que as abelhas estão expostas durante sua atividade de forrageamento, bem como as possíveis soluções que englobam os inseticidas botânicos e a nanotecnologia, esse estudo tem por objetivo o diagnóstico dos efeitos citotóxicos do extrato de piretro encapsulado (nanopesticida) no intestino médio de abelhas nativas *T. angustula*, além de observar as alterações histológicas causadas por esse inseticida carregado por nanopartícula lipídica sólida, bem como na sua forma isolada. Adicionalmente, também há a comparação dos efeitos em nível histológico entre o extrato de piretro isolado e a formulação comercial de um piretróide, a deltametrina, para indicar se o inseticida botânico pode representar uma alternativa menos tóxica ao uso convencional de compostos sintéticos desse grupo de agrotóxicos.

## **3.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.2.1 Obtenção do agrotóxico e nanopartícula**

O extrato de piretro Pestanal® (extrato do inseticida botânico, CAS 8003-34-7, pureza  $\geq 99\%$ ) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich®.

As nanopartículas foram preparadas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - *campus* Sorocaba, no laboratório de Nanotecnologia Ambiental, em parceria com Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto e Dr.<sup>a</sup> Cristiane Ronchi de

Oliveira, conforme metodologia e caracterização descrita em Oliveira et al. (2019a) e esquematização em Anexo 1.

### 3.2.2 Bioensaio com *T. angustula*

O bioensaio foi realizado pela Dr<sup>a</sup>. Hellen Maria Soares-Lima, processo PNPD/CAPES nº 88882.306809/2018-1. Abelhas da espécie *T. angustula* foram coletadas em atividade de voo na entrada de três diferentes colônias manejadas (Sorocaba, SP, Brasil, 23°34'52.0"S 47°31'33.8"W) e colocadas em potes plásticos de 250 mL previamente furados contendo um microtubo do tipo eppendorf com solução de sacarose 50% açúcar + 50% água para alimentação dos indivíduos. Em cada pote plástico foram mantidas 10 abelhas provenientes da mesma colônia, as quais foram mantidas em temperatura ambiente (em torno de 25°C) durante 24 horas.

Após esse período, os alimentadores dos potes foram substituídos e os potes foram separados em sete grupos experimentais ensaiados em triplicata (N = 30 abelhas, sendo 10 abelhas de cada uma das três colônias por pote), conforme a solução presente no alimentador, sendo eles: I. Controle (CTLE): solução de sacarose 50% m/v; II. Controle solvente (CA): solução de sacarose com acetona 0,144%; III. Extrato de Piretro (PIR): solução de sacarose contendo 0,144 ng/μL de extrato de piretro dissolvido previamente em acetona; IV. Nanopartícula lipídica sólida (NLS): solução de sacarose contendo nanopartículas isoladas na concentração usada no grupo III; V. Extrato de Piretro encapsulado em nanopartículas (NLS+PIR): solução de sacarose contendo 0,144 ng/μL de extrato de piretro carregado por nanopartícula; VI. Deltametrina (DELTA): solução de sacarose com deltametrina na dose recomendada pelo fabricante, contendo 0,144 ng/μL de piretro (formulação comercial do piretro); e VII. Acetato de polivinila (PVA): solução de sacarose contendo surfactante empregado na confecção das nanopartículas. As concentrações para cada substância foram baseadas em estudo realizado por Dorigo et al. (2018), contendo o *intake* para espécie *T. angustula*, e no estudo de Oliveira et al. (2019) com *A. mellifera*, para comparação entre espécies, sendo 0,144 ng/μL para jataí correspondente a 1 ng/μL para *A. mellifera*.

As abelhas foram mantidas em temperatura ambiente por 24 horas em exposição contínua via oral (*ad libitum*). Após essa etapa, 15 indivíduos de cada grupo experimental foram anestesiados a -4°C até a dormência e os intestino médios foram

dissecados e imediatamente fixados em paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7,0 por 24 horas em baixa temperatura, e, em seguida, submetido a desidratação lenta em solução crescente de etanol em baixa temperatura, segundo protocolo para processamento histológico descrito em Silva-Zacarin et al. (2012), com posterior inclusão em historesina.

### **3.2.3 Análise histológica**

Para a análise morfológica do intestino, duas lâminas não sequenciais de cada indivíduo foram hidratadas em água destilada durante 10 minutos e coradas em Hematoxilina por 25 minutos. Posteriormente, foram lavadas rapidamente em água corrente e então coradas em Eosina 0,5% durante 2 minutos. Após lavagem rápida em água destilada e secas em temperatura ambiente, foram montadas em meio de montagem ERV-Mount. Para cada lâmina, três secções histológicas não consecutivas, nos quais o intestino médio apresentava lúmen aberto, foram analisadas em fotomicroscópio Leica®, totalizando seis secções histológicas por indivíduo e 18 secções por grupo experimental. Após observação das lâminas e análise dos biomarcadores celulares para intestino de abelhas descritos na literatura (GRELLA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019a; TADEI et al., 2020), sete tipos de alterações no órgão (lesões) foram elencados para análise e diagnóstico dos efeitos do inseticida piretro carregado ou não por nanopartícula lipídica sólida (Tabela 1).

### **3.2.4 Análise semiquantitativa do intestino médio**

Para o diagnóstico das lesões no intestino médio, estabeleceu-se dois parâmetros: escore de frequência (a), sendo 0 - ausente, 1 - pouco frequente, 2 - moderadamente frequente e 3 - muito frequente, e fator de importância patológica (w), sendo 1 - mínima (dano reversível), 2 - moderada (dano geralmente reversível) e 3 - severa (dano irreversível) (adaptado de OLIVEIRA et al., 2019a; TADEI et al., 2020) (Tabela 1).

Os ninhos de células regenerativas foram contados em todas as secções histológicas dos grupos experimentais e comparados ao grupo Controle. Aos valores obtidos, foram atribuídos os escores, sendo 0 (5 ou mais ninhos em todo intestino), 1 (3 ou 4 ninhos), 2 (1 a 3 ninhos) e 3 (ausência de ninhos).

Tabela 1. Lesão no órgão e respectivo fator de importância.

Lesão	Fator de importância patológica (w)
Diferenciação celular nos ninhos regenerativos	1
Secreção apócrina	1
Liberação de células para o lúmen	1
Esferocristais	1
Marginalização cromatínica	2
Aumento no tamanho dos vacúolos citoplasmáticos	2
Redução de ninhos de células regenerativas	3

Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2019a) e Tadei et al. (2020).

Posteriormente, foi calculado o índice de lesão para cada alteração por indivíduo utilizando os fatores de importância multiplicados pelos valores de escores de frequência das lesões, conforme seguinte equação de Bernet et al. (1999):

$$I_{le} = a \times w$$

Equação 1

Por fim, o índice de lesões total no órgão foi calculado por meio da somatória dos índices de lesão ( $\Sigma I_{le}$ ), representado pela Equação 2 extraída de Bernet et al. (1999):

$$I_{org} = \Sigma I_{le} (a \times w)$$

Equação 2

### 3.2.5 Análise estatística

A análise dos dados para cada alteração utilizou os conjuntos de valores obtidos e foram comparados estatisticamente entre os grupos experimentais utilizando o programa R (versão 4.1.1; *R Foundation for Statistical Computing Vienna, AT, 2021*). Segundo Teste Shapiro-Wilk, os dados obtidos para cada lesão não apresentaram distribuição normal. Dessa forma, os testes realizados para as lesões foram: Modelo Linear Generalizado (Família Quasi-Poisson e Modelo Zero-Inflacionado) para esferocristais e redução de ninhos de células regenerativas, utilizando os pacotes hnp (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017), emmeans (LENTH, 2021), multcomp

(HOTHORN; BRETZ; WESTFALL, 2008), MASS (VENABLES; RIPLEY, 2002), doBy (HØJSGAARD; HALEKOH, 2021) e pscl (JACKMAN, 2020); e teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Wilcoxon, com os pacotes multcompView (GRAVES et al., 2019) e rcompanion (MANGIAFICO, 2021), para as lesões marginalização da cromatina, secreção apócrina, liberação de células e diferenciação de ninhos de células regenerativas.

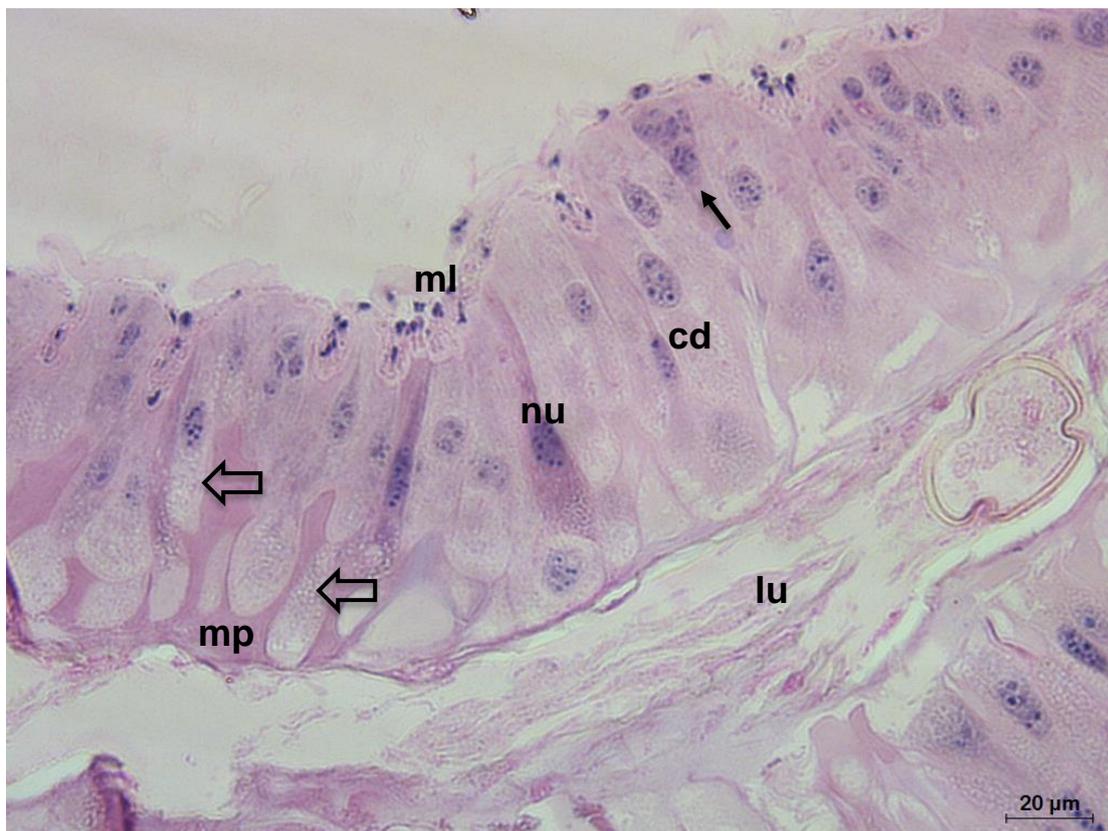
Para cálculo da média e intervalo de confiança foi utilizado o pacote Rmisc (HOPE, 2013). Os gráficos de efeito foram plotados por meio do pacote daBest (HO et al., 2019) e foram analisados para todas as lesões.

Para cálculo do índice de lesão no órgão por grupo foi feito Teste Shapiro-Walk, indicando normalidade dos dados. Dessa forma, realizou-se teste Anova seguido do pós-teste Tukey de comparação múltipla.

### **3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Em relação a análise histológica comparativa entre os grupos controles e expostos, não houve comprometimento da citoarquitetura do intestino médio, apesar da observação de alterações nas células digestivas do epitélio intestinal, portanto os dados evidenciaram similaridade entre os grupos controles e os expostos (Figura 2). O intestino médio de *T. angustula* possui estrutura similar ao de *A. mellifera*, se apresentando na forma tubular. O epitélio é apoiado por uma lâmina basal e é constituído por células prismáticas, denominadas células digestivas, as quais são recobertas por microvilosidades, enquanto as células basais são células regenerativas agrupadas em “ninho”. O lúmen, por sua vez, é delimitado pela matriz peritrófica (CRUZ-LANDIM, 2009) (Figura 2).

Figura 2. Fotomicrografia da citoarquitetura do intestino de *T. angustula* (grupo Controle). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 400x. As letras indicam: cd – célula digestiva; nu – núcleo; lu – lúmen; ml – músculo; mp – matriz peritrófica. A seta preta indica ninho de células regenerativas. A seta vazia com contorno preto indica vacúolos citoplasmáticos.



Fonte: Autoria própria (2021).

As lesões “compactação da cromatina no núcleo” e “núcleos picnóticos”, comumente relatadas no intestino médio em estudos ecotoxicológicos com abelhas *A. mellifera* (DOMINGUES et al., 2020; GRELLA et al., 2019; JACOB et al., 2014; TADEI; MENEZES-OLIVEIRA; SILVA-ZACARIN, 2020), não foram observadas em nenhum dos grupos experimentais, portanto, não foram adicionadas a este trabalho.

Esferocristais foram observados em baixa frequência nas secções histológicas dos grupos experimentais. Eles são naturalmente produzidos pelas células epiteliais do intestino de abelhas forrageiras, tendo como função a osmorregulação e neutralização de xenobióticos (SERRÃO et al., 2008). No entanto, essa lesão não demonstrou diferença entre os grupos expostos e controles ( $p \leq 1$ ) (Figura 3A).

Em relação a lesão “marginalização da cromatina” (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 59,46$ ,  $gl = 6$ ,  $p < 0,001$ ), o grupo DELTA ( $3,777 \pm 0,470$ ) teve um aumento de mais de duas vezes em relação ao CTLE ( $1,333 \pm 1,182$ ) e os demais grupos experimentais.

Ressalta-se a diferença entre os grupos DELTA e PIR ( $0,778 \pm 0,604$ ), na qual o DELTA demonstrou aumento de mais de três vezes na marginalização da cromatina em comparação ao PIR, já que a deltametrina é a formulação comercial do piretro (Figura 3B).

A marginalização da cromatina pode ser um indicativo do início de processo de apoptose (um tipo de morte celular programada) nessas células (MORAES; BOWEN, 2000; SILVA-ZACARIN; TABOGA; MORAES, 2006). Apesar desse processo ocorrer naturalmente no indivíduo ao longo de sua vida e aumentar em frequência conforme a idade da abelha (ELMORE et al., 2007; MORAES; BOWEN, 2000), o estresse químico causado por aumentar a frequência de morte celular. Estudos realizados com as espécies de abelha *Apis mellifera* (CARVALHO et al., 2009; DECOURTYE et al., 2009), *Scaptotrigona tubiba* (MORAES; BAUTISTA; VIANA, 2000) e *Melipona quadrifasciata* (DEL SARTO et al., 2014) expostas à deltametrina concluíram que esse agrotóxico diminui a sobrevivência das abelhas, sendo considerado altamente tóxico. Além disso, outros estudos utilizando a *A. mellifera* evidenciaram que esse inseticida neurotóxico pode prejudicar a atividade de forrageamento ao provocar alterações no voo (FREITAS; PINHEIRO, 2010), diminuição na capacidade de retorno à colônia (FREITAS; PINHEIRO, 2010) e induzir hipotermia (VANDAME; BELZUNCES, 1998). Morfologicamente, a deltametrina pode afetar as células epiteliais do intestino médio de organismos não-avulsos, como por exemplo em abelhas *A. mellifera* na qual foi observado aumento de vacúolos citoplasmáticos e separação da membrana basal no epitélio (ALJEDANI, 2017; ALJEDANI; SHIBOUB; ALMEHMADI, 2017); e em efêmera *Callibaetis radiatus*, na qual a exposição aumentou a frequência de apoptose nas células digestivas (GUTIERREZ et al., 2016). Nesse estudo, a formulação comercial do piretro (deltametrina) também induziu o aumento na frequência de morte celular pela exposição oral nas células digestivas do intestino médio.

Em relação aos vacúolos presentes nas células digestivas, todos os grupos apresentaram alteração quanto ao tamanho e frequência desses vacúolos (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 54,493$ ,  $gl = 6$ ,  $p < 0,001$ ), exceto CTLE e DELTA. O PVA ( $3,100 \pm 0,509$ ) apresentou uma frequência maior de aumento do tamanho dos vacúolos citoplasmáticos em comparação aos demais grupos, cerca de três vezes mais, incluindo NSL ( $1,700 \pm 0,895$ ) e NSL+PIR ( $2,000 \pm 0,591$ ), ainda que o PVA seja usado na formulação das nanopartículas (Figura 3C).

A vacuolização citoplasmática é uma característica morfológica presente no intestino devido ao processo fisiológico de autofagia, promovendo a renovação de organelas e reorganização do citoplasma, sendo inclusive frequente durante as fases de remodelação de órgãos na metamorfose nas abelhas (SILVA-ZACARIN, 2007; SILVA-ZACARIN et al., 2011). O intestino de *T. angustula* apresenta um epitélio bastante vacuolizado, no entanto, o aumento na frequência e tamanho desses vacúolos é indicativo de resposta celular ao estresse e pode levar à degeneração epitelial (no caso de vacuolização degenerativa), possibilitando perda da função intestinal. Diversos estudos demonstram aumento na vacuolização no intestino médio de *A. mellifera* após exposição a xenobióticos, como fungicidas (CARNEIRO et al., 2020; TADEI et al., 2020), inseticidas (CATAE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013) e nanopartículas de óxido metálico (DABOUR et al., 2020), além de estudo com meliponídeo realizado por Domingues et al. (2020), no qual houve aumento na vacuolização na base das células digestivas após exposição à concentração intermediária de fungicida. Nenhum dos grupos com alterações no tamanho dos vacúolos apresentou vacuolização degenerativa com perda evidente de citoplasma. Como resposta ao estresse celular induzido por xenobióticos, células digestivas podem aumentar o processo de autofagia (eliminação de organelas potencialmente danificadas pelo xenobiótico) (CRUZ-LANDIM; SERRÃO; SILVA-DE-MORAES, 1996; GRELLA et al., 2019) ou aumentar a produção de vesículas de secreção que subsequentemente aumenta a liberação de secreção apócrina que, por sua vez, pode ser uma forma indireta de proteção tecidual contra o xenobiótico (GRELLA et al., 2019). Nesse estudo, o grupo PVA apresentou maior frequência no aumento da vacuolização citoplasmática, indicando citotoxicidade desse surfactante em *T. angustula*.

O aumento da secreção apócrina no intestino de abelhas expostas a diferentes tipos de xenobióticos é frequentemente relatado nos estudos toxicológicos (BATISTA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2019a). No presente estudo, o grupo NSL ( $2,000 \pm 0,381$ ) aumentou em aproximadamente duas vezes mais a produção e liberação de secreção apócrina em relação ao CTLE ( $0,222 \pm 0,273$ ) e demais grupos (NSL+PIR, PVA) (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 54,421$ , gl = 6,  $p < 0,001$ ) (Figura 3D). A secreção apócrina é liberada pela parte apical das células epiteliais e é composta de enzimas digestivas e substâncias da matriz peritrófica que são

secretadas para o lúmen (CRUZ-LANDIM; SERRÃO; SILVA-DE-MORAES, 1996). Um aumento na produção e liberação, no entanto, pode significar uma resposta celular desencadeada por um estressor (GRELLA et al., 2019). Semelhante resultado é apresentado em relação a liberação de células para o lúmen. A liberação de células ocorre naturalmente para renovação do epitélio intestinal, mas o aumento na frequência desse processo é indicativo de estresse ao xenobiótico (BATISTA et al., 2020; CASTRO et al., 2020). Neste trabalho, os grupos PVA ( $1,160 \pm 0,191$ ), NSL ( $0,400 \pm 0,254$ ) e NSL+PIR ( $0,100 \pm 0,336$ ) apresentaram aumento na frequência de liberação de células para o lúmen em comparação ao CTLE ( $0,500 \pm 0,256$ ), cerca de uma vez mais (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 36,293$ ,  $gl = 6$ ,  $p < 0,001$ ) (Figura 3E). CA e CTLE não diferiram estatisticamente, assim como PIR e DELTA em relação aos respectivos controles ( $p < 0,001$ ).

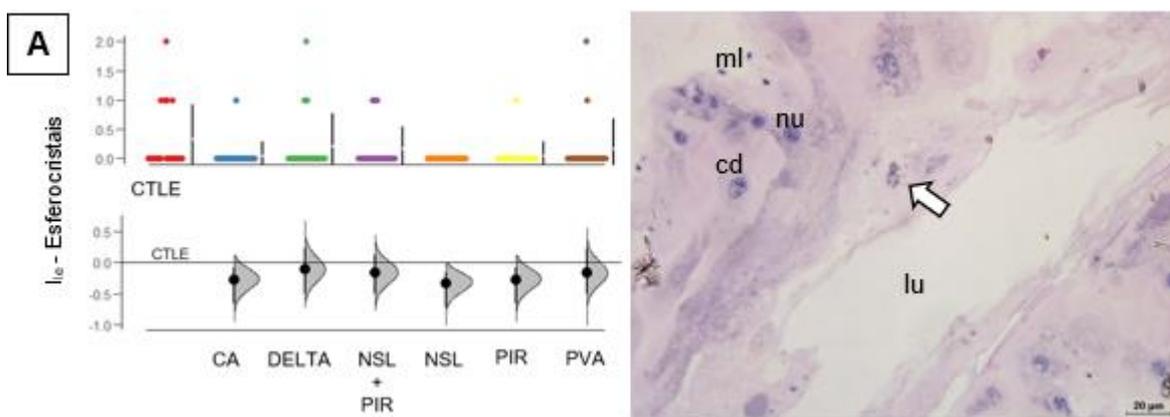
Estudos demonstram que a exposição a xenobióticos podem causar aumento na liberação de secreção apócrina e de células digestivas para o lúmen, como evidenciado em estudos de abelhas expostas a diferentes inseticidas, a exemplo: imidacloprido (CATAE et al., 2017), espinosade (LOPES et al., 2017), ácido bórico e fipronil (CRUZ et al., 2010) e nanopartículas (isoladas e carreadoras do piretro) (OLIVEIRA et al., 2019a), além de estudo realizado com percevejos da espécie *Podisus nigrispinus* expostos ao piretróide sintético permetrina (MARTÍNEZ et al., 2018) e estudo com meliponídeo *Melipona scutellaris* exposto ao fungicida piraclostrobina (DOMINGUES et al., 2020). Nesse estudo, os resultados indicam que a nanopartícula isolada induziu o aumento na frequência de ambas as lesões, indicando que, apesar de não conter o princípio ativo do agrotóxico, ainda apresenta citotoxicidade ao intestino. No entanto, ambas as lesões são reversíveis, pois a diferenciação de células regenerativas dos ninhos pode recuperar o dano epitelial de forma rápida, não causando alteração na sobrevivência das abelhas (GRELLA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019a).

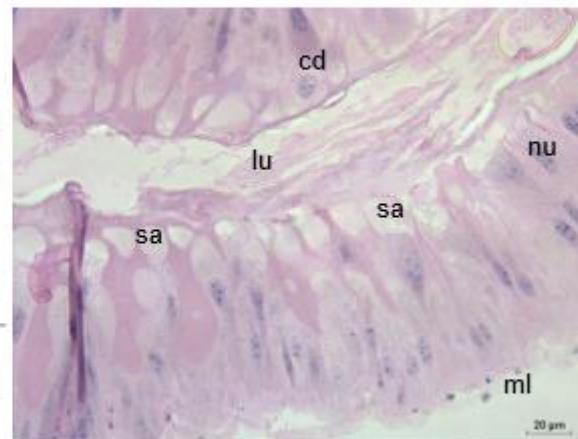
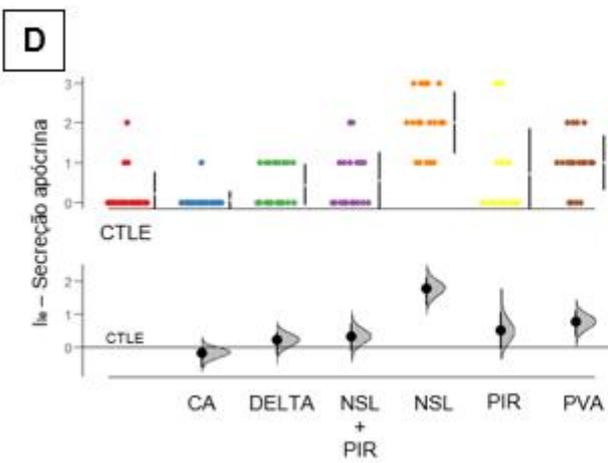
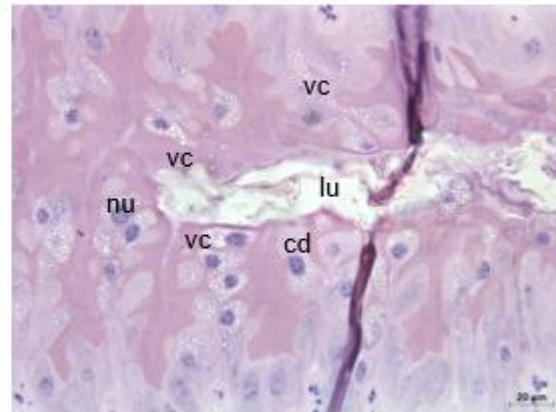
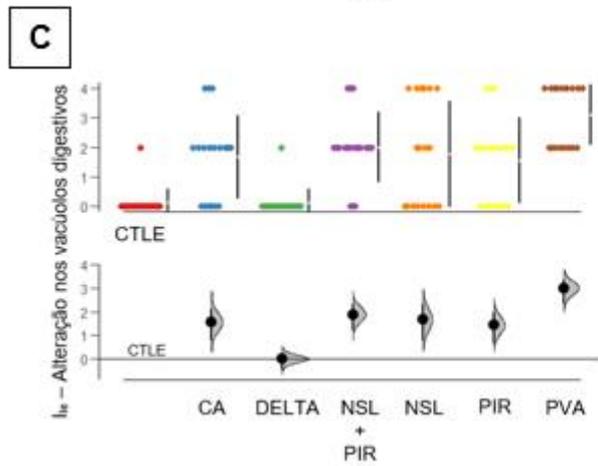
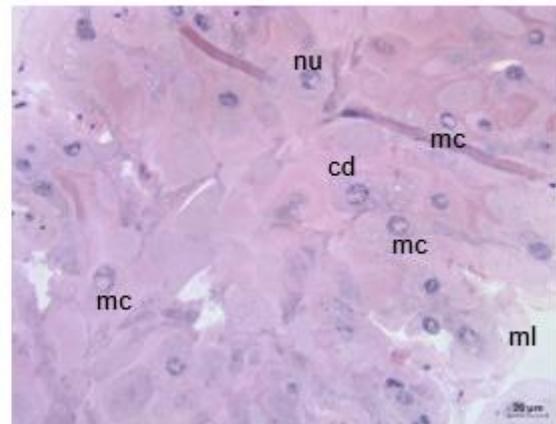
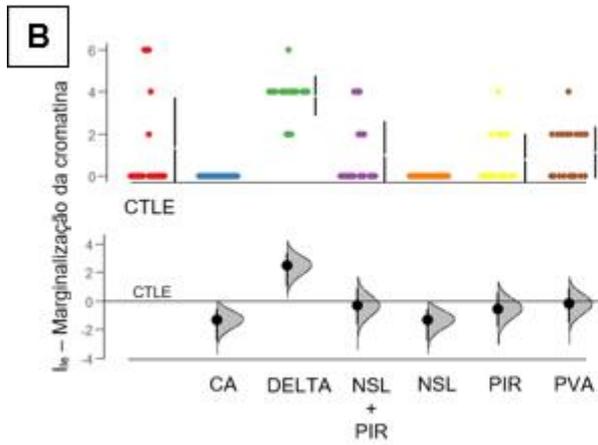
Em relação à redução de ninhos de células regenerativas, os controles CA ( $3,000 \pm 1,144$ ) e CTLE ( $0,333 \pm 0,482$ ) diferiram na quantidade de ninhos ( $p = 0,002$ , GLM - Zero Inflacionado). Os grupos NSL e NSL+PIR não diferiram do CTLE, enquanto os demais grupos, incluindo CA, apresentaram diminuição na quantidade de ninhos, cerca de duas a três vezes menos (Figura 3F). Já em relação à diferenciação de ninhos regenerativos, grupo DELTA ( $4,000 \pm 0,950$ ) demonstrou aumento de cerca

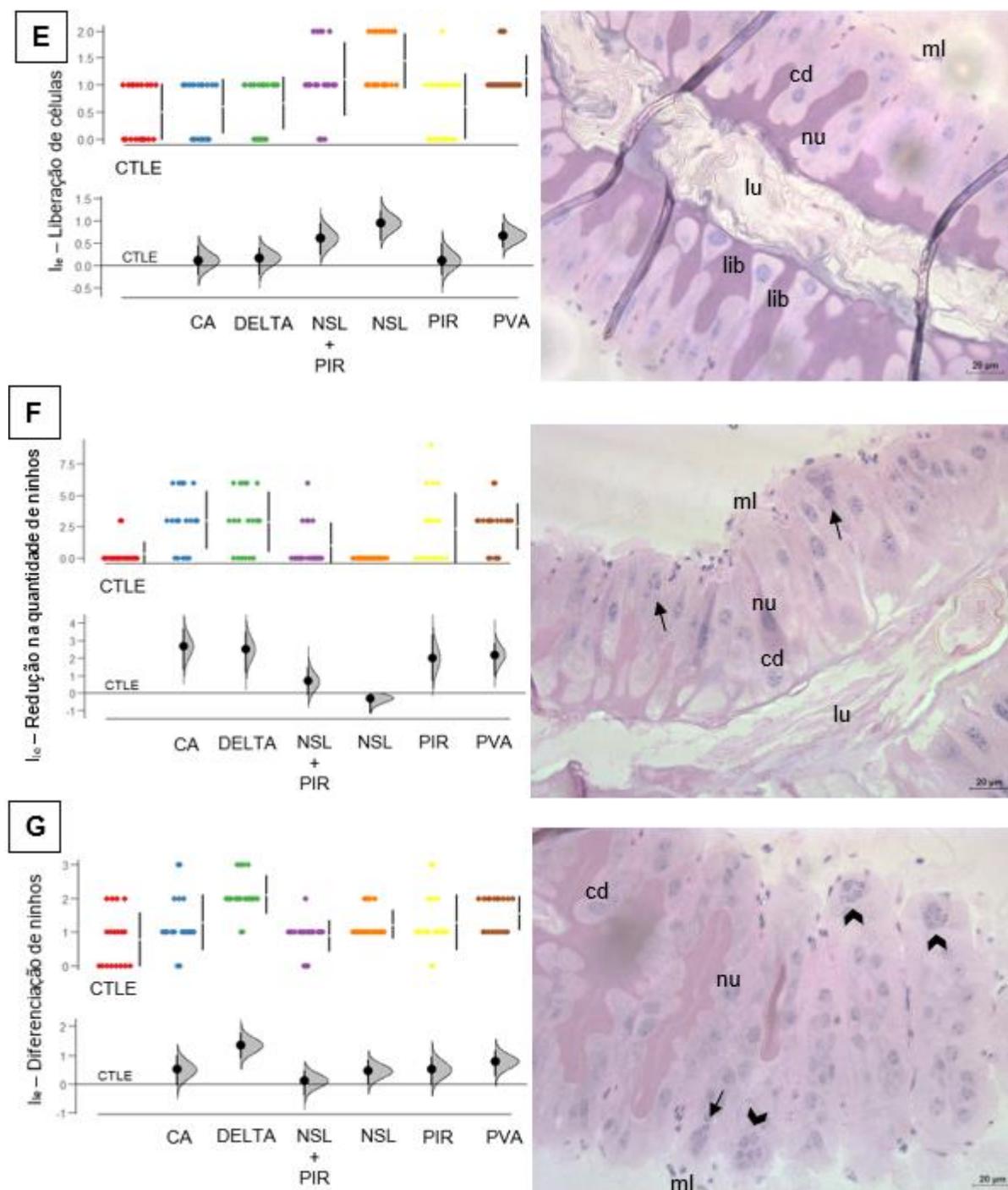
de três vezes na quantidade de ninhos regenerativos diferenciados em comparação ao CTLE e demais grupos (PIR, NLS+PIR) (Kruskal-Wallis,  $\chi^2 = 37,637$ , gl = 6,  $p < 0,001$ ) (Figura 3G).

A diferenciação dos ninhos de células regenerativas ocorre para substituir as células digestivas danificadas ou senescentes (CRUZ-LANDIM; SERRÃO; SILVA-DE-MORAES, 1996). A atenção para essa lesão se deve a grande presença de ninhos em processo de diferenciação e já totalmente diferenciados, pois demonstra intensa necessidade de renovação epitelial no intestino. Já a diminuição na quantidade de ninhos é considerada uma lesão grave devido a perda da possibilidade de renovação celular, sendo assim, uma vez que os ninhos se diferenciam totalmente, as futuras células liberadas no lúmen não serão repostas, causando dano irreversível (GRELLA et al., 2019). Estudos demonstram que a exposição a agrotóxicos pode causar a diminuição de ninhos regenerativos, como em abelhas expostas ao fungicida azoxistrobina (ORSI, 2020), inseticida tiametoxam (GRELLA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013) e clotianidina (CAMARGO, 2019). Ressalta-se estudo realizado com *T. angustula* exposta ao inseticida botânico azadiractina em concentração subletal, no qual houve ausência de ninhos regenerativos após 24h de exposição. Embora todos os grupos, com exceção dos grupos com nanopartículas, tenham apresentado redução nos ninhos de células regenerativas no presente estudo, a formulação comercial do piretro (deltametrina) induziu tanto a diferenciação dos ninhos como a redução destes, indicando uma possível degeneração epitelial devido a menor possibilidade de substituição das células liberadas para o lúmen.

Figura 3. Fotomicrografia de intestino médio de *Tetragonisca angustula* corada com Hematoxilina e Eosina em aumento 400x. - Estimativa do tamanho de efeito das lesões celulares e representação da lesão. O eixo superior dos gráficos evidencia a distribuição do índice de lesão e no eixo inferior estão plotada as médias com seus devidos intervalos de confiança e tamanho de efeito comparativo ao controle. CTLE: controle; CA: controle acetona; DELTA: deltametrina; NSL+PIR: piretro nanoencapsulado; NSL: nanopartícula isolada; PIR: extrato de piretro; PVA: acetato de polivinila;  $I_e$ : índice de lesão; A: Esferocristais; B: Marginalização da cromatina; C: Alteração nos vacúolos citoplasmáticos; D: Secreção apócrina; E: Liberação de células; F: Diferenciação de ninhos; G: Redução na quantidade de ninhos. As letras minúsculas indicam: cd: célula digestiva; nu: núcleo; lu: lúmen; mc: marginalização da cromatina; vc: vacúolo citoplasmático; lib: liberação de célula; sa: secreção apócrina; ml: músculo. Seta larga branca contornada de preto indica esferocristais. Seta preta indica ninho de célula regenerativa não diferenciado. Ponta da seta preta indica ninho de célula regenerativa em diferenciação ou diferenciado.







Fonte: Autoria própria (2021).

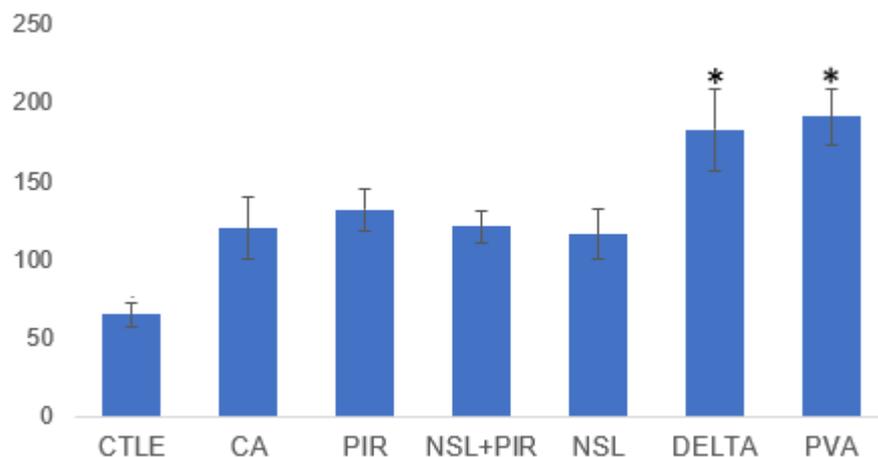
Os grupos PVA ( $10,611 \pm 1,618$ ) e DELTA ( $10,167 \pm 1,665$ ) apresentaram índice de lesão no órgão estatisticamente mais altos que os demais grupos experimentais e CTLE (Figura 4,  $p < 0,001$ ). Comparando com o estudo de Oliveira et al. (2019a) realizado com *A. mellifera*, o PVA não apresentou diferença significativa em relação aos controles no aumento das lesões, o que indica uma sensibilidade diferente de *T.*

*angustula* a esse surfactante isolado. O acetato de polivinila é um polímero sintético da família dos ésteres polivinílicos. Segundo uma de suas fichas de segurança, não há dados sobre possíveis riscos ecológicos (ROTH, 2016), no entanto, de acordo com outra empresa que comercializa o produto, o PVA pode ser tóxico a organismos aquáticos, além de ser esperado que sua degradação seja lenta, embora não haja dados que comprovem essa hipótese (TEKBOND, 2014). Sendo assim, o PVA pode apresentar toxicidade a organismos não alvos, e esse presente estudo demonstra sua toxicidade para a espécie nativa *T. angustula*.

Em relação ao extrato de piretro carregado ou não por nanopartícula, não houve diferença estatística considerando esse índice, bem como entre a nanopartícula isolada ou como carreadora do piretro. O grupo CTLE teve o índice significativamente menor comparado ao restante dos grupos. No estudo de Oliveira et al. (2019a), o extrato de piretro em concentração mais elevada ( $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) e as nanopartículas isoladas causaram alterações histológicas mais significativas em relação aos outros grupos, enquanto as nanopartículas carreadoras de extrato de piretro nas concentrações  $1$  e  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  foram consideradas seguras para as abelhas expostas à curto prazo, assim como a concentração mais baixa de extrato de piretro ( $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ). Neste presente estudo, a concentração usada foi semelhante a concentração mais baixa ( $0,144 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) e os resultados para a espécie *T. angustula* foram aproximados. Para melhor comparação, a espécie também deve ser exposta a concentração mais alta do extrato de piretro e do inseticida encapsulado em nanopartícula. Ressalta-se que ambas as espécies dos estudos mostraram alterações quando expostas às nanopartículas isoladas, manifestando a necessidade de maiores estudos ambientais sobre as consequências dos resíduos gerados na nanotecnologia.

Em comparação com o inseticida em formulação comercial (deltametrina), o inseticida botânico extrato de piretro demonstrou causar menos alterações histopatológica nos indivíduos de *T. angustula*, podendo ser uma alternativa mais segura ao uso de piretróides e outros inseticidas sintéticos. Apesar do acetato de polivinila isolado aumentar as lesões no órgão, quando usado na formulação das nanopartículas não apresentou o mesmo efeito, demonstrando estabilidade na formulação da nanopartícula.

Figura 4. Índice de Lesão Total no intestino médio de *Tetragonisca angustula* após exposição oral as soluções testes. Asteriscos indicam diferença significativa em comparação ao controle. CTLE – controle; CA – controle acetona; PIR – piretro; NSL+PIR – piretro encapsulado em nanopartícula lipídica sólida; NSL – nanopartícula isolada; DELTA – deltametrina; PVA – acetato de polivinila.



Fonte: Autoria própria (2021).

No Brasil, a avaliação ambiental figura uma das etapas necessárias para registro de agrotóxicos, segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama). Essa avaliação baseia-se em testes em laboratório e em campo para compreensão dos efeitos das substâncias químicas em questão nos seres vivos e no ambiente, como solos e corpos hídricos. A Lei Federal nº 7.802/1989, o Decreto nº 4.074/2002 e o Decreto nº 8.973/2017 dispõem sobre a regulação dos agrotóxicos no país, bem como delega ao Ministério do Meio Ambiente realizar a avaliação ambiental dos produtos e seus componentes, enquanto cabe ao Ibama realizar a análise, registro e controle de agrotóxicos, seus componentes e afins. Ressalta-se que, ainda que se saiba dos riscos e efeitos tóxicos dos agrotóxicos para organismos não-alvos e humanos, a aprovação de novos princípios ativos e produtos cresceu demasiadamente nos últimos quatro anos e atingiu recorde histórico em 2020, manifestando necessidade de revisão da legislação referente aos agrotóxicos (NUNES et al., 2021). Em relação aos inseticidas botânicos, a legislação que os regula é a mesma para os agrotóxicos sintéticos. No entanto, a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015 aborda a pesquisa e o desenvolvimento de produtos biológicos e o acesso ao patrimônio genético, dessa forma, também regula a produção de inseticidas botânicos (HALFELD-VIEIRA et al., 2016).

Apesar da importância da nanotecnologia em diversas áreas, incluindo a possível diminuição de impactos de agrotóxicos em organismos não-alvos, é necessário atentar-se à falta de legislação sobre o tema. Na União Europeia, por exemplo, já há regulação por parte da *European Food Safety Authority* (EFSA), enquanto nos Estados Unidos, há vistoria por parte da *Food and Drug Administration* (FDA). No Brasil, não há protocolos padronizados para os testes de toxicidade de nanopartículas nem para avaliação dos impactos ambientais destas. Embora exista legislação visando a proteção do solo e recursos hídricos e gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por substâncias provenientes de atividades humanas (Resolução CONAMA nº 420, de 28 de dezembro de 2009), ainda há necessidade de se ter uma regulação nacional sobre os produtos nanotecnológicos para que possíveis impactos à saúde humana e ambiental sejam evitados ou mitigados, principalmente se considerar que a nanotecnologia já está em contato com o meio ambiente e biota terrestre e aquática diariamente (FERREIRA; SANT'ANNA, 2015; LAZZARETTI; HUPFFER, 2019).

Entender os possíveis efeitos prejudiciais dos agrotóxicos na saúde apícola, bem como compreender como novas tecnologias podem impactar esses organismos está intimamente ligado com a sustentabilidade global, como visto, por exemplo, na Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas (ONU). A Agenda 2030 dá continuidade à Agenda de Desenvolvimento do Milênio, tendo seu início em 2016 e abrangendo o desenvolvimento econômico, a erradicação da pobreza, da miséria e da fome, a inclusão social, a sustentabilidade ambiental e a boa governança em todos os níveis, incluindo paz e segurança. O Objetivo 2 visa “garantir a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promoção a agricultura sustentável”, enquanto o Objetivo 15 pretende “proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da terra e deter a perda”. Com base nesses objetivos e no que foi exposto nesse trabalho, fica nítido que precisamos compartimentalizar a produção agrícola nas premissas da sustentabilidade, buscando meios produtivos mais seguros e ambientalmente corretos, que possam proteger a nossa biodiversidade, bem como produzir alimentos mais seguros para população.

Nossos dados mostraram que o extrato de piretro representa uma alternativa viável para a agricultura e mais segura para organismos não-alvos, como as abelhas,

em comparação ao inseticida sintético deltametrina. Os inseticidas botânicos já foram utilizados no passado em várias lavouras, mas foram deixados de lado pelos agrotóxicos convencionais, que tem maior persistência nas culturas (AGUIAR-MENEZES, 2005). No entanto, com o aumento da resistência das pragas aos agrotóxicos comumente utilizados e seu risco aos organismos não-alvos, os inseticidas botânicos voltaram a se destacar, demonstrando aumento na procura e comercialização desses produtos, assim como a pesquisa e desenvolvimento de novas formulações naturais (HALFELD-VIEIRA et al., 2016). Espera-se maiores iniciativas por parte de governos e instituições de regulação para que o consumo de formulações menos tóxicas seja objetivado.

A análise da viabilidade dos nanopesticidas ainda necessita de maior embasamento científico para que se possa entender os efeitos ambientais das nanopartículas, dessa forma, estudos com outros animais e organismos devem ser realizados, em especial utilizando espécies não-alvo. Visto que nanopartículas apresentam maior permeabilidade as membranas, é possível a maximização da sua toxicidade devido a sua maior reatividade com organismo, algo que precisa ser considerado na escala produtiva, pois precisamos de soluções que sejam eficientes, mas também menos impactantes. Por fim, basear-se em estudos científicos realizados com espécies nativas, como este, para criação de novos modelos para estudos ecotoxicológicos, bem como para as tomadas de decisão relacionadas à conservação ambiental e o desenvolvimento sustentável, é de suma importância para que os objetivos descritos sejam cumpridos.

### **3.4 Conclusões**

A hipótese deste estudo foi parcialmente aceita. O extrato de piretro carregado por nanopartícula e o extrato de piretro e a nanopartícula isolados não apresentaram diferenças significativas nas lesões do intestino médio de *T. angustula*, porém tanto o extrato de piretro isolado como carregado por nanopartícula demonstraram ser menos citotóxicos do que a formulação comercial deltametrina, dessa forma, representando alternativas mais seguras ao uso de piretróides sintéticos.

Ressalta-se a necessidade de expor a espécie a outras concentrações do inseticida botânico (isolado e encapsulado nas nanopartículas) que também possam

estar presentes como resíduo nos agroecossistemas, além da realização de estudos adicionais expondo outras espécies de abelhas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F. R. **Toxicologia Ambiental**. Londrina: Editora e Distribuidora Educacional S.A., 2017. 216 p.

ABRASCO. Agronegócio e pandemia no Brasil: uma sindemia está agravando a pandemia de COVID-19?. **Associação Brasileira de Saúde Coletiva/IPEN**, 2021. 47 p. Disponível em: <[https://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2021/05/Agronegocio\\_-\\_ABrasco-IPEN.pdf](https://www.abrasco.org.br/site/wp-content/uploads/2021/05/Agronegocio_-_ABrasco-IPEN.pdf)>. Acesso em: 06/out/2021.

AGUIAR-MENEZES, E. L. **Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 58 p.

ALJEDANI, D. M. Effects of abamectin and deltamethrin to the foragers honeybee workers of *Apis mellifera jemenatica* (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 5, p. 1007-1015, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.007>

ALJEDANI, D. M.; SHIBOOB, M. H.; ALMEHMADI, R. M. Effects of Some Insecticides on the Midgut of the Foragers Honeybee Worker *Apis mellifera jemenatica*. Journal of King Abdulaziz University - **Meteorology, Environment and Arid Land Agriculture Sciences**, v. 27, n.1, p. 59-66, 2017. DOI: 10.4197/Met.27-1.6

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/agrotoxicos/programa-de-analise-de-residuos-em-alimentos/arquivos/3770json-file-1>>. Acesso em: 08/out/2021.

ARAGÃO, A.; CONTINI, E. O agro no Brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020. **Embrapa SIRE**, 2021. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/62618376/O+AGRO+NO+BRASIL+E+N>

O+MUNDO.pdf/41e20155-5cd9-f4ad-7119-945e147396cb>. Acesso em: 27/out/2021.

ARENA, M.; SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 324–334, 2014.

ARYA, A. K.; SINGH, A.; BHATT, D. Pesticide applications in agriculture and their effects on birds: An overview. In: KUMAR, V.; *et al.* Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation. India: **Agriculture and Environmental Science Academy**, 2019. DOI: 10.26832/AESA-2019-CAE-0163-010

BAKER, S.; *et al.* Nanoagroparticles emerging trends and future prospect in modern agriculture system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 10-17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.04.012>

BATISTA, A. C.; *et al.* Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees?. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 834-843, 2020. DOI: 10.1080/00218839.2020.1724678

BAULLI, S. C.; *et al.* Alterações morfológicas no intestino médio das abelhas sem ferrão *Tetragonisca angustula* Latreille (1811) (Hymenoptera, Trigoniini) expostas a azadiractina. **27º Encontro Anual de Iniciação Científica**, Universidade Estadual de Maringá, 2018. Disponível em: <<http://www.eaic.uem.br/eaic2018/anais/artigos/2753.pdf>>. Acesso em: 03/nov/2021.

BERNET, D. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999.

BOMFIM, I. M. A.; OLIVEIRA, M. O.; FREITAS, B. M. Biologia das Abelhas. **Fundação Universidade Estadual do Ceará**, Fortaleza, p. 07-53, 2017.

BOND, C.; BUHL, K.; STONE, D. Pyrethrins General Fact Sheet. **National Pesticide Information Center**, Oregon State University Extension Services. 2014. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/pyrethrins.html>>. Acesso em: 06/out/2021.

BOOSE, P. How Agricultural Nanotechnology Will Influence the Future of Farming Sustainability. **Azonano**, 2021. Disponível em: <<https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=5647>>. Acesso em: 08/out/2021.

BOVI, T. S. **Toxicidade de inseticidas para abelhas *Apis mellifera* L.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, 2013.

CABRAS, P.; *et al.* Behavior of some pesticide residues on greenhouse tomatoes. 2. Fungicides, acaricides, and insecticides. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 33, n. 5, p. 935-937, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf00065a040>

CAMARGO, I.F. Análise dos efeitos do agrotóxico clotianidina no intestino médio e túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), 2019.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. 306 p.

CARNEIRO, F. F; *et al.* **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CARNEIRO, L. S.; *et al.* The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 1-7, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>

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

CASTRO, M. D. A.; *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, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126075>

CATAE, A. F.; *et al.* Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Ecotoxicology**, v. 27, p. 109–121, 2017. DOI: 10.1007/s10646-017-1874-4

CEPEA/CNA. PIB do Agronegócio Alcança Participação de 26,6% no PIB Brasileiro em 2020. **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea)/Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA)**. 2021. Disponível em: <[https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/sut.pib\\_dez\\_2020.9mar2021.pdf](https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/sut.pib_dez_2020.9mar2021.pdf)>. Acesso em: 06/out/2021.

CHAM, K. O.; *et al.* Pesticide Exposure Assessment Paradigm for Stingless Bees. **Environmental Entomology**, v. 48, ed. 1, p. 36–48, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/ee/nvy137>

CORTEVA. Bula Expedition. 2019. Disponível em: [chrome-extension://efaidnbmninnkcbpcbjpcpgclklefndmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.corteva.com.br%2Fcontent%2Fdam%2Fdpagco%2Fcorteva%2Fla%2Fbr%2Fproducts%2Ffiles%2FBula\\_Expedition.pdf&clen=311482&chunk=true](chrome-extension://efaidnbmninnkcbpcbjpcpgclklefndmkaj/viewer.html?pdfurl=https%3A%2F%2Fwww.corteva.com.br%2Fcontent%2Fdam%2Fdpagco%2Fcorteva%2Fla%2Fbr%2Fproducts%2Ffiles%2FBula_Expedition.pdf&clen=311482&chunk=true). Acesso em: 26/out/2021.

CORTOPASSI-LAURINO, M. A abelha jataí: uma espécie bandeira? (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1881). **Mensagem Doce**, v. 80, p. 34–38, 2005.

CRUZ, A. S.; *et al.* Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae : Morphological alterations in the

midgut of *A. mellifera*. **Cell Biology and Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 165-176, 2009. DOI: 10.1007/s10565-009-9126-x

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

CRUZ-LANDIM, C.; SERRÃO, J.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M. Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. **Cytobios**, v. 353, p. 95-104, 1996.

DABOUR, K.; *et al.* Cellular alterations in midgut cells of honey bee workers (*Apis mellifera* L.) exposed to sublethal concentrations of CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 1356-1367, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.311>

DECOURTYE, A.; *et al.* Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p. 410-419, 2004.

DEL SARTO, M. C. L.; *et al.* Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 45, p. 626-636, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0281-6>

DOMINGUES, C. E. C.; *et al.* Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111395>

DORIGO, A. S.; *et al.* Biological Data of Stingless Bees with Potential Application in Pesticide Risk Assessments. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 777-779, 2018. DOI: 10.13102/sociobiology.v65i4.2878

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

EL-SAAD, A. M. A.; KHEIRALLAH, D. A.; EL-SAMAD, L. M. Biochemical and histological biomarkers in the midgut of *Apis mellifera* from polluted environment at Beheira Governorate, Egypt. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 3181–3193, 2017.

EMBRAPA. **Visão 2030: O Futuro da Agricultura Brasileira**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018. 214 p.

ERICKSON, B. J.; ERICKSON, E. H. Honey bee and pesticide. II – Facts and common sense. **American Bee Journal**, v. 123, n. 11, p. 797-805, 1983.

FAO. **Pollinators Challenge Badge**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2021. 180 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/cb4803en/cb4803en.pdf>>. Acesso em: 07/out/2021.

FERREIRA, A. P.; SANT'ANNA, L. S. A Nanotecnologia e a Questão da sua Regulação no Brasil: Impactos à Saúde e ao Ambiente. **Revista UNIANDRADE**, v. 16, n. 3, p. 1-10, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.18024/1519-5694/revuniandrade.v16n3p119-128>

FIELD, L. M.; *et al.* Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. **European Biophysics Journal**, v. 46, p. 675–679, 2017.

FIGUEIREDO, J.; RODRIGUES, D. J. Effects of four types of pesticides on survival, time and size to metamorphosis of two species of tadpoles (*Rhinella marina* and *Physalaemus centralis*) from the southern Amazon, Brazil. **Herpetological Journal**, v. 24, p. 7-15, 2014.

FISHER, A. Protect pollinators — reform pesticide regulations. **Nature**, v. 595, n. 7866, p. 172–172, 2021.

FRANKLIN, E. L.; RAINE, N. E. Moving beyond honeybee-centric pesticide risk assessments to protect all pollinators. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 10, p. 1373–1375, 2019.

FREITAS; B. M.; PINHEIRO, J. N. Efeitos sub-letais dos pesticidas agrícolas e seus impactos no manejo de polinizadores dos agroecossistemas brasileiros. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 282-298, 2010. DOI:10.4257/oeco.2010.1401.17

FRIEDRICH, K.; *et al.* Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, ed. 00061820, p. 1-18, 2021.

GARIBALDI, L. A.; *et al.* Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits. **Ecology Letters**, v. 14, n. 10, p. 1062-1072, 2011.

GHIDAN, A. Y.; ANTARY, T. M. A. Applications of Nanotechnology in Agriculture. *In*: STOYTCHEVA, M. Applications of Nanobiotechnology. **IntechOpen**, p. 1-13, 2020.

GIANNINI, T. C.; *et al.* Projected climate change threatens pollinators and crop production in Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182274>

GIL, F.; PLA, A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. **Journal Applied Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 245-255, 2001. DOI: 10.1002/jat.769

GOULSON, D.; *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1435-1446, 2015.

GRAVES, S.; PIEPHO, H.; SELZER, L.; DORAI-RAJ, S. multcompView: Visualizations of Paired Comparisons. R package version 0.1-8, 2019. <https://CRAN.R-project.org/package=multcompView>

GRELLA, T. C. **Efeitos de nanodoses do inseticida tiametoxam para a abelha *Melipona scutellaris* Latreille, 1911 (Hymenoptera, Apidae): da absorção ao órgão alvo.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos – campus Araras, 2017.

GRELLA, T. C.; *et al.* Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. **Chemosphere**, v. 236, p. 1-5, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.225>

GRUE, C. E.; GIBERT, P. L.; SEELEY, M. E. Neurophysiological and Behavioral Changes in Non-Target Wildlife Exposed to Organophosphate and Carbamate Pesticides: Thermoregulation, Food Consumption, and Reproduction. **American Zoological**, v. 37, p. 369-388, 1997.

GUTIÉRREZ, Y; *et al.* Deltamethrin-Mediated Toxicity and Cytomorphological Changes in the Midgut and Nervous System of the Mayfly *Callibaetis radiatus*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152383>

HALFELD-VIEIRA, B. A.; *et al.* **Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas.** Brasília: Embrapa, 2016. 853 p.

HELGASON, T.; *et al.* Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, ed. 1, p. 75-81, 2009.

HENRY, M.; *et al.* A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348-350, 2012. DOI: [10.1126/science.1215039](https://doi.org/10.1126/science.1215039)

HIRATA, R. Piretróides: Estrutura Química - Atividade Biológica. **Química Nova**, v. 18, n. 4, p. 368-374, 1995.

HO, J.; *et al.* Moving beyond P values: Everyday data analysis with estimation plots. *Nature Methods*, n. 16, p. 565-566, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0470-3>

HOPE, R. M. Rmisc: Ryan Miscellaneous. R package version 1.5. <https://CRAN.R-project.org/package=Rmisc>

HOTHORN, T.; BRETZ, F.; WESTFALL, P. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal*, v. 50, n. 3, p. 346-363, 2008.

ISSX. About ISSX. **International Society for the Study of Xenobiotics**. Disponível em: <<https://www.issx.org/page/AboutISSX>>. Acesso em: 06/out/2021.

JACOB, C. R. O.; *et al.* Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. *Pest Management Science*, v. 71, n. 1, p. 114-122, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3776>

JACKMAN, S. pscl: Classes and Methods for R Developed in the Political Science Computational Laboratory. United States Studies Centre, University of Sydney. Sydney, New South Wales, Australia. 2020. R package version 1.5.5. <https://github.com/atahk/pscl/>

JAFFE, B. D.; LOIS, A. N.; GUÉDOT, C. Effect of Fungicide on Pollen Foraging by Honeybees (Hymenoptera: Apidae) in Cranberry Differs by Fungicide Type. *Journal of Economic Entomology*, v. 112, n. 1, p. 499–503, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/jee/toy353>

JOHNSON, R. M.; *et al.* Pesticides and honey bee toxicity – USA. *Apidologie*, v. 41, p. 312–331, 2010. DOI: [10.1051/apido/2010018](https://doi.org/10.1051/apido/2010018)

JONES-COSTA, M.; *et al.* Cardiac biomarkers as sensitive tools to evaluate the impact of xenobiotics on amphibians: the effects of anionic surfactant linear alkylbenzene sulfonate (LAS). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 151, p. 184-190, 2018.

KERR, W. E. A importância da meliponicultura para o país. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 1, p. 42-44, 1997.

KIM, D.; *et al.* Recent developments in nanotechnology transforming the agricultural sector: a transition replete with opportunities. **Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 3, p. 849-864, 2018. DOI: 10.1002/jsfa.8749.

KLEIN, A.; *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.

LAZZARETTI, L. L.; HUPFFER, H. M. Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, v. 16, n. 3, p. 153-177, 2019. DOI: <https://doi.org/10.25112/rgd.v16i3.1792>

LENTH, R. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.7.0. 2021. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>

LI, Z.; *et al.* Brain transcriptome of honey bees (*Apis mellifera*) exhibiting impaired olfactory learning induced by a sublethal dose of imidacloprid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 156, p. 36–43, 2019.

LOPES, M. P.; *et al.* Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, p. 1311-1318, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4815>

LOPES, M.; FERREIRA, J. B.; SANTOS, G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 4, p. 7-9, 2005.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell Markers for Ecotoxicological Studies in Target Organs of Bees. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 3-4, p. 303-309, 2006.

MANGIAFICO, S. rcompanion: Functions to Support Extension Education Program Evaluation. R package version 2.4.1. 2021. <https://CRAN.R-project.org/package=rcompanion>

MARTÍNEZ, L. C.; *et al.* Permethrin induces histological and cytological changes in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. **Chemosphere**, v. 212, p. 629-637, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.134

MEA. Relatório da Avaliação Ecosistêmica do Milênio. **Millennium Ecosystem Assessment**, 2005. Disponível em: <<https://www.millenniumassessment.org/documents/document.446.aspx.pdf>>. Acesso em 07/out/2021.

MEDICI, E. P.; *et al.* Lowland tapir exposure to pesticides and metals in the Brazilian Cerrado. **Wildlife Research**, v. 48, n. 5, p. 393-403, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1071/WR19183>

MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; *et al.* Hazard assessment of the pesticides KRAFT 36 EC and SCORE in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 2919-2924, 2018.

MIOTELO, L.; *et al.* *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, v. 268, 2021.

MITRA, A.; CHATTERJEE, C.; MANDAL, F. B. Synthetic Chemical Pesticides and Their Effects on Birds. **Research Journal of Environmental Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 81-96, 2011. DOI: 10.3923/rjet.2011.81.96

MORAES, R.; BOWEN, I. Modes of cell death in the hypopharyngeal gland of the honey bee (*Apis mellifera* L). **Cell Biology International**, v. 24, n.10, p. 737-743, 2000. DOI: 10.1006/cbir.2000.0534

MORAES, R. F. Agrotóxicos no Brasil: Padrões de Uso, Política da Regulação e Prevenção da Captura Regulatória. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - Ipea**, 2019. 78 p.

MORAES, S. S.; BAUTISTA, A. R. L.; VIANA, B. F. Avaliação da Toxicidade Aguda ( $DL_{50}$  e  $CL_{50}$ ) de Inseticidas para *Scaptotrigona tubiba* (Smith) (Hymenoptera: Apidae): Via de Contato. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 1, p. 31-37, 2000.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, p. 1-23, 2017. doi: 10.18637/jss.v081.i10

MOSCARDI, A. C.; SOUZA, A. C. Z.; FIGUEIREDO, C. A. C. Avaliação da toxicidade do 2,4-D por meio da histopatologia e histoquímica do intestino médio e corpo gorduroso de *Rhinocricus padbergi* (diplópodo). **Brazilian Applied Science Review**, Curitiba, v. 2, n. 5, p. 1636-1657, 2018. ISSN 2595-3621

NIVA, C. C.; BROWN, G. G. **Ecotoxicologia Terrestre: Métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília: Embrapa, 2019. 258 p.

NOCELLI, R. C. F.; *et al.* Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. **Insect Physiology**, v. 6, p. 13–23, 2016.

NUNES, A.; *et al.* The influence of recent Brazilian policy and legislation on increasing bee mortality. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e36910414157, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i4.14157.

<sup>a</sup>OLIVEIRA, C. R.; *et al.* Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. **Chemosphere**, v. 236, n. 124282, p. 1-12, 2019a.

<sup>b</sup>OLIVEIRA, C. R.; *et al.* Pyrethrum extract encapsulated in nanoparticles: Toxicity studies based on genotoxic and hematological effects in bullfrog tadpoles.

**Environmental Pollution**, v. 253, p. 1009-1020, 2019b. DOI: 10.1016/j.envpol.2019.07.037

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

OLIVEIRA, R. A.; *et al.* Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2013. DOI: 10.1002/tox

OLSVIK, P. A.; *et al.* Effects of Agricultural Pesticides in Aquafeeds on Wild Fish Feeding on Leftover Pellets Near Fish Farms. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fgene.2019.00794

ORSI, L. **Análise dos efeitos de agrotóxicos sobre a espécie *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos - *campus* Araras, Centro De Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, 2020.

ORTIZ-DELGADO, J.B., FUNES, V.; SARASQUETE, C. The organophosphate pesticide -OP- malathion inducing thyroidal disruptions and failures in the metamorphosis of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 57, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1786-z>

PATTERSON, A. D.; GONZALEZ, F. J.; IDLE, J. R. Xenobiotic Metabolism – A View Through The Metabolometer. **Chemical Research in Toxicology**, v. 23, n. 5, p. 851-860, 2010. DOI: 10.1021/tx100020p

PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014. DOI: 10.13102/sociobiology.v61i4.348-354

PEREIRA, B. V. R.; *et al.* Assessment of biochemical alterations in the neotropical fish species *Phalloceros harpagos* after acute and chronic exposure to the drugs paracetamol and propranolol. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 14899-14910, 2018.

PETTIS, J. F.; *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, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>

PIRES, C. S. S.; *et al.* Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

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

RCPOL. Espécies de plantas visitadas por *Tetragonisca angustula*. **Rede de Catálogos Polínicos Online** – Palinoecologia, 2016. Disponível em: <<http://chaves.rcpol.org.br/interaction-profile/Tetragonisca%20angustula>>. Acesso em: 11/nov/2021.

RÊGO, M.; ALBUQUERQUE, P. Árvores do cerrado e seus inquilinos: as abelhas sem ferrão. **Mensagem Doce**, n. 100, 2009. Disponível em: <<https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/100/artigo8.htm>>. Acesso em 03/nov/2021.

ROCHA, B. A.; BARBOSA JÚNIOR, F. Contaminantes Emergentes (1º Capítulo): Bisfenol A e análogos. **Nanocell News**, v. 2, n. 1, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.15729/nanocellnews.2014.09.29.002>

ROSA-FONTANA, A.; *et al.* What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. **Environmental Pollution**, v. 265, 2020.

ROTH, C. Ficha de Dados de Segurança: Acetato de Polivinila. 2016. Disponível em: <[https://www.carlroth.com/downloads/sdb/pt/9/SDB\\_9154\\_PT\\_PT.pdf](https://www.carlroth.com/downloads/sdb/pt/9/SDB_9154_PT_PT.pdf)>. Acesso em: 12/nov/2021.

SABRA, F.; MEHANA, E. Pesticides Toxicity in Fish with Particular Reference to Insecticides. **Asian Journal of Agriculture and Food Sciences**, v. 3, p. 40-60, 2015.

SAMARGHANDI, M. R.; *et al.* Residue Analysis of Pesticides, Herbicides, and Fungicides in Various Water Sources Using Gas Chromatography-Mass Detection. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 5, p. 2189–2195, 2017. DOI: <https://doi.org/10.15244/pjoes/70387>

SANTOS, A. B. Abelhas nativas: polinizadores em declínio. **Natureza On Line**, São Francisco de Assis, p. 103-106, 2010. Disponível em: <[http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01\\_santosab\\_103106.pdf](http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_santosab_103106.pdf)>. Acesso em: 07/out/2021.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides - uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2007.

SANTOS, M. L. A. **Pólen Coletado por *Apis mellifera* no Diagnóstico da Poluição Ambiental Causada por Praguicidas e Metais no Brasil**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Botucatu, 2005.

SCHMOLKE, A. *et al.* Assessment of the Vulnerability to Pesticide Exposures Across Bee Species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 2640–2651, 2021.

SERRÃO, J. E.; *et al.* Ultrastructure of anterior midgut region of corbiculate bees (Hymenoptera: Apidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 5, p. 915–921. DOI: <https://doi.org/10.1093/aesa/101.5.915>

SGOLASTRA, F. *et al.* Bees and pesticide regulation: Lessons from the neonicotinoid

experience. **Biological Conservation**, v. 241, p. 108356, 2020.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Autophagy**. v. 3, n. 5, p. 516-518, 2007. PMID: 17643072.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; *et al.* Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, ed. 1, p. 696–703, 2012.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; *et al.* Structure and function of the intestine and malpighian tubules: from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. **Social Insects: Structure, Function and Behavior**, p. 121–142, 2011.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; TABOGA, S. R.; MORAES, R. L. M. S. Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Micron**, v. 39, n. 2, p. 117-127, 2008. DOI: 10.1016/j.micron.2006.12.001

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação**. Belo Horizonte: Silveira, 2002.

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

SNODGRASS, R. E. The Anatomy of the Honey Bee. **U.S. Department of Agriculture. Technical Series**, n. 18, p. 09-151, 1910.

HØJSGAARD, S.; HALEKOH, U. doBy: Groupwise Statistics, LSmeans, Linear Contrasts, Utilities. R package version 4.6.11. 2021. <https://CRAN.R-project.org/package=doBy>

STICKEL, L. F. Pesticide Residues in Birds and Mammals. In: EDWARDS, C. A. Environmental Pollution by Pesticides. **Environmental Science Research**, v. 3, 1973. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8942-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8942-6_8)

SULTATOS, L. G. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, n. 3, p. 271-289, 1994. DOI: 10.1080/15287399409531921

TADEI, R.; MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis mellifera* and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 1-11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115622>

TAYLOR, M. P. Bees as biomarkers. **Nature Sustainability**, v. 2, n. 3, p. 169-170, 2019.

TEKBOND. FISPQ - Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos. 2014. Disponível em: [www.cec.com.br/%2Fimages%2FProductFiles%2Fd3b6b7bf9ce946a9b372fab9634876aa\\_fispq\\_FISPQ\\_n.0037\\_COLA\\_PVA\\_UNIVERSAL\\_ghs\\_rev\\_05\\_15.pdf&clen=71890&chunk=true](http://www.cec.com.br/%2Fimages%2FProductFiles%2Fd3b6b7bf9ce946a9b372fab9634876aa_fispq_FISPQ_n.0037_COLA_PVA_UNIVERSAL_ghs_rev_05_15.pdf&clen=71890&chunk=true)>. Acesso em: 12/nov/2021.

TEIXEIRA, E.; FERREIRA, E.; LUZ, C.; MARTINS, M.; RAMOS, T.; LOURENÇO, A. European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 172, 2020. DOI: 10.1016/j.jip.2020.107357

TISON, L.; *et al.* The neonicotinoid clothianidin impairs memory processing in honey bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 139–145, 2019.

TORDIN, C. Contaminantes emergentes podem ser uma ameaça na água para consumo humano. **Embrapa**, Notícias, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/32796742/contaminantes->

emergentes-podem-ser-uma-ameaca-na-agua-para-consumo-humano>. Acesso em 07/nov/2021.

TOYNTON, K.; *et al.* Permethrin General Fact Sheet. **National Pesticide Information Center**, Oregon State University Extension Services, 2009. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/PermGen.html>>. Acesso em: 07/nov/2021.

UNEP. Safer use of chemicals can help protect biodiversity. **UN Environment Programme**, Nature Action, 2020. Disponível em: <<https://www.unep.org/news-and-stories/story/safer-use-chemicals-can-help-protect-biodiversity>>. Acesso em: 11/nov/2021.

USMAN, M.; *et al.* Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, v. 721, ed. 137778, p. 1-16, 2020.

VANDAME, R.; BELZUNCES, L. P. Joint actions of deltamethrin and azole fungicides on honey bee thermoregulation. **Neuroscience Letters**, v. 17, n. 251, p. 57-60, 1998. DOI: 10.1016/S0304-3940(98)00494-7

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. **Springer**, New York, 2002.

VENTURIERI, G.; *et al.* Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola. *In*: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; *et al.* **Polinizadores no Brasil - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2012. 488 p.

VILLAFUERTE, R.; *et al.* Nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 39, n. 1, p. 38-52, 2008.

VISHAL SONI, A. A. Use of Pyrethrin/Pyrethrum and its Effect on Environment and Human: A Review. **PharmaTutor**, v. 2, ed. 6, p. 52-60, 2014.

WITTER, S.; *et al.* Abelhas sem ferrão no Rio Grande do Sul: distribuição geográfica, árvores importantes para nidificação e sustentabilidade regional. **Mensagem Doce**, n. 100, 2009. Disponível em: <<https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/100/artigo10.htm>>. Acesso em: 03/nov/2021.

YOON, G.; PARK, J. W.; YOON, I. S. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs): recent advances in drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 43, p. 353–362, 2013. DOI: 10.4103/1735-5362.235156

## ANEXOS

## Anexo 1

Figura 5. Nanopartículas lipídicas sólidas. A) Representação esquemática das nanopartículas lipídicas sólidas com o extrato de piretro. B) Visualização de nanopartículas lipídicas sólidas em solução a partir do equipamento de rastreamento de partículas (NTA).



Fonte: OLIVEIRA, C. R. Nanopartículas lipídicas sólidas como sistemas carreadores de extrato de piretro e avaliação toxicológica em organismos não-alvos. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, 2019.