

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE**

**Laís Carraro**

**INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO SUBLETAL AO CLORANTRANILIPROLE SOBRE  
O DESENVOLVIMENTO LARVAL, MORFOMETRIA E A FORMAÇÃO DA  
MUSCULATURA DE VOO DE *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807)**

ARARAS/SP  
2025

## **LAÍS CARRARO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente da Universidade Federal de São Carlos, Campus de Araras, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.

**Orientadora:** Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

**Coorientação:** Prof. Dr. Matheus Mantuanelli Roberto

Carraro, Laís

Influência da exposição subletal ao clorantraniliprole sobre o desenvolvimento larval, morfometria e a formação da musculatura de voo de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) / Laís Carraro -- 2025. 66f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras

Orientador (a): Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Banca Examinadora: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara, Profa. Dra. Annelise Rosa Fontana

Bibliografia

1. Ecotoxicologia . 2. Abelhas sem ferrão. 3. Agrotóxico.  
I. Carraro, Laís. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8  
7083



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Agrárias  
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Lais Carraro, realizada em 29/04/2025.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara (UFSCar)

Profa. Dra. Annelise Rosa Fontana (UCM)

Prof. Dr. Matheus Mantuanelli Roberto (FHO)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente.

“A persistência é o caminho do êxito.”  
*Charles Chaplin*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente às pessoas que me incentivaram a seguir em frente.

Aos meus pais, Eliana e Mauricio, e aos meus avós, Waldomira e José, por todo amor, apoio e esforços pela minha criação e educação.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAs), pelo companheirismo e alegria, que tornaram essa jornada mais leve e significativa.

Aos pesquisadores que contribuíram de alguma maneira com minha pesquisa, seja por treinamentos, bancas ou pelas conversas e sugestões que enriqueceram meu trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, e ao meu coorientador, Prof. Dr. Matheus Mantuanelli Roberto, pela confiança durante a minha orientação.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - Campus Araras), ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente (PPGAA), aos professores que contribuíram para minha formação, aos servidores e colegas de turma, cujo apoio e dedicação tornaram essa caminhada mais inspiradora e enriquecedora. Também à Fundação Hermínio Ometto (FHO - Campus Araras) e à Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP - Campus Rio Claro) pelo apoio fundamental na realização das pesquisas.

Por fim, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Da mesma maneira, à Capes e à Fapesp (Processo: 2024/00110-5) pelo apoio financeiro desta pesquisa, bem como à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Araras, SP, Brasil.

## RESUMO GERAL

As abelhas são os principais polinizadores dos ambientes naturais e agrícolas, visitando cerca de 90% das culturas, das quais 48% estão diretamente relacionadas à alimentação humana. Durante o forrageamento, elas podem coletar pólen e néctar contaminados por agrotóxicos, como o clorotraniliprole, e transportá-los até a colmeia. Com isso, as larvas acabam expostas a esses resíduos, o que pode comprometer seu desenvolvimento e afetar a formação de tecidos importantes, como a musculatura de voo. Assim, este estudo avaliou o efeito de concentrações subletais de clorotraniliprole sobre o desenvolvimento larval, a morfometria e a formação da musculatura de voo de abelhas *Scaptotrigona postica*. Para isso, larvas foram expostas a cinco tratamentos: controle negativo (CN - apenas alimento); controle positivo (CP - dimetoato a 6,9 ng i.a./larva); controle do solvente (CA - acetona a 0,2%); clorotraniliprole 1 (CL1 - 2,04 ng i.a./larva) e 2 (CL2 - 0,204 ng i.a./larva). Durante o desenvolvimento, foram registrados marcos como entrada no quinto ínstar (5<sup>o</sup>I), defecação (DF), pupa de diferentes cores de olhos (PB - brancos; PR - rosados; PM - marrons; PP - pretos), e emergência (EM), além de verificação diária da mortalidade. Foram determinadas taxas de mortalidade, pupação e emergência. As abelhas emergentes foram submetidas a análises morfométricas da largura da cabeça (MC) e distância intertegular (MI). Paralelamente, a musculatura de voo foi dissecada e analisada histologicamente por Hematoxilina e Eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Azul de Metileno (AM), Tricrômico de Mallory (MY) e Tricrômico de Masson (MN). Adicionalmente, foram realizadas medições nucleares das células musculares. Foi verificada a normalidade dos dados, optando-se por ANOVA/Tukey ou Kruskal-Wallis/Dunn, e foi construída a curva de probabilidade de sobrevivência com o método de Kaplan-Meier. Os resultados indicaram que apenas CP causou toxicidade, apresentada por alterações nas taxas de mortalidade larval, pupação e emergência, assim como na mortalidade em cada estágio de desenvolvimento. Em relação ao estágio anterior de desenvolvimento das abelhas, apenas CL2 apresentou diferença de mortalidade de DF para PB e de PR para PM. Apesar de não haver efeito letal dentro de um mesmo estágio, houve variação na taxa de mortalidade entre os períodos de 5<sup>o</sup>I em CA e CL2. A curva de Kaplan-Meier e o teste Log-Rank de Mantel-Cox revelaram diminuição significativa na probabilidade de sobrevivência para larvas expostas ao CL2. As análises morfométricas mostraram um aumento significativo na largura da cabeça em CL1 e na distância intertegular em CL2. As análises histológicas do músculo de voo revelaram que as concentrações CL1 e CL2 apresentaram pontos focais de desorganização, presença de vacúolos citoplasmáticos e alteração nas fibras. Também foi observada a presença de hemócitos na matriz extracelular e entre as fibras. Conclui-se que, embora o clorotraniliprole não tenha induzido mortalidade larval, inibição da taxa de pupação e emergência nas abelhas expostas, ele influenciou negativamente o desenvolvimento e a formação da morfometria. Além disso, induziu danos significativos na formação da musculatura de voo, tão importante para a atividade de forrageamento.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos, diamidas, meliponini, mandaguari, abelha sem ferrão.

## GENERAL ABSTRACT

Bees are the main pollinators of both natural and agricultural environments, visiting approximately 90% of crop species, of which 48% are directly related to human food production. During foraging, they may collect pollen and nectar contaminated with pesticides, such as chlorantraniliprole, and transport them back to the hive. As a result, larvae are exposed to these residues, which can compromise their development and affect the formation of essential tissues, such as flight musculature. This study evaluated the effects of sublethal concentrations of chlorantraniliprole on larval development, morphometry, and flight muscle formation in *Scaptotrigona postica* bees. For this, larvae were exposed to five treatments: negative control (CN – food only); positive control (CP – dimethoate at 6.9 ng a.i./larva); solvent control (CA – acetone at 0.2%); chlorantraniliprole 1 (CL1 – 2.04 ng a.i./larva); and chlorantraniliprole 2 (CL2 – 0.204 ng a.i./larva). During development, key milestones were recorded: entry into the fifth instar (5<sup>o</sup>I), defecation (DF), pupae with different eye colors (PB – white; PR – pink; PM – brown; PP – black), and emergence (EM), in addition to daily monitoring of mortality. Mortality, pupation, and emergence rates were determined. Emerged bees were subjected to morphometric analyses of head width (MC) and intertegular distance (MI). Simultaneously, the flight muscles were dissected and histologically analyzed using Hematoxylin and Eosin (HE), Periodic Acid-Schiff (PAS), Methylene Blue (AM), Mallory's Trichrome (MY), and Masson's Trichrome (MN). Additionally, nuclear measurements of muscle cells were performed. Data normality was assessed, and ANOVA/Tukey or Kruskal-Wallis/Dunn tests were applied accordingly. The Kaplan-Meier method was used to construct the survival probability curve. Results indicated that only CP caused toxicity, presented by impacts in rates of larval mortality, pupation, and emergence, as well as in mortality during each developmental stage. Regarding developmental progression, only CL2 showed significant differences in mortality from DF to PB and from PR to PM. Although no lethal effects were observed within the same stage, mortality rate variation was noted during the 5<sup>o</sup>I period between CA and CL2. The Kaplan-Meier curve and Mantel-Cox Log-Rank test revealed a significant decrease in survival probability for larvae exposed to CL2. Morphometric analyses showed a significant increase in head width in CL1 and in intertegular distance in CL2. Histological analyses of the flight muscles revealed that both CL1 and CL2 presented focal points of tissue disorganization, presence of cytoplasmic vacuoles, and alterations in muscle fibers. Additionally, hemocytes were observed within the extracellular matrix and among muscle fibers. It is concluded that, although chlorantraniliprole did not induce larval mortality or inhibit pupation and emergence rates, it negatively influenced development and morphometric parameters. Furthermore, it caused significant damage to the formation of the flight musculature, which is essential for foraging activity.

**Keywords:** Pesticides, diamides, meliponini, mandaguari, stingless bee.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO 1

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Coleta dos discos de cria no meliponário do grupo ASA's.....  | 12 |
| Figura 2. Alimento larval fresco extraído dos discos de cria coletados.....   | 13 |
| Figura 3. Exposição das larvas <i>S. postica</i> aos tratamentos nas placas de acrílico.....  | 14 |
| Figura 4. Medição da largura da cabeça e distância intertegular de abelhas <i>S. postica</i> criadas <i>in vitro</i> .....              | 16 |
| Figura 5. Estágios de desenvolvimento larval de <i>S. postica</i> .....   | 17 |
| Figura 6. Estágios de desenvolvimento pupal até a pré-emergência de <i>S. postica</i> .....   | 18 |
| Figura 7 - Probabilidade de sobrevivência de <i>S. postica</i> após exposição aos tratamentos durante o período de desenvolvimento..... | 21 |

### ARTIGO 2

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Abelhas recém-emergidas mantidas em gaiolas para a maturação da musculatura de voo.....  | 41 |
| Figura 2. Análise da área nuclear das fibras musculares de <i>S. postica</i> expostas aos diferentes tratamentos com clorantraniliprole.....   | 45 |
| Figura 3 - Seções histológicas do músculo de voo de <i>S. postica</i> expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com hematoxilina e eosina.....                                    | 47 |
| Figura 4 - Seções histológicas do músculo de voo de <i>S. postica</i> expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com Ácido Periódico de Schiff.....                                | 49 |
| Figura 5 - Seções histológicas do músculo de voo de <i>S. postica</i> expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval corado com Hematoxilina e Eosina e contra corado com Azul de Metileno..... | 51 |
| Figura 6 - Seções histológicas do músculo de voo de <i>S. postica</i> expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com hematoxilina, eosina e Azul de Metileno, em detalhe.....      | 52 |
| Figura 7 - Seções histológicas do músculo de voo de <i>S. postica</i> expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com Tricrômico de Mallory.....                                    | 53 |
| Figura 8 - Seções histológicas do músculo de voo de <i>S. postica</i> expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com Tricrômico de Masson.....                                     | 54 |

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Resultados de taxas de mortalidade, pupação e emergência de <i>S. postica</i> após exposição aos tratamentos.....                                  | 19 |
| Tabela 2 - Resultados de mortalidade acumulativa entre os diferentes estágios de desenvolvimento de <i>S. postica</i> , após exposição aos tratamentos.....   | 20 |
| Tabela 3 – Eventos que ocorrem de acordo com o desenvolvimento em dias de <i>S. postica</i> após exposição aos tratamentos.....                               | 23 |
| Tabela 4 - Resultados das medições da largura da cabeça e da distância intertegular de abelhas <i>S. postica</i> adultas, após exposição aos tratamentos..... | 24 |

### ARTIGO 2

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Resultados da medição da área dos núcleos avaliados nas fibras musculares de abelhas de <i>S. postica</i> expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval..... | 55 |
|---|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5<sup>o</sup>I - Quinto ínstar  
AM - Azul de Metileno  
ASA's - Abelhas e os Serviços Ambientais  
B.O.D. - Demanda Bioquímica de Oxigênio  
CA - Controle acetona  
CL1 - Clorantraniliprole Concentração 1  
CL2 - Clorantraniliprole Concentração 2  
CN - Controle negativo  
CP - Controle positivo  
DF - Defecação  
HR - *Hazard Ratio* (Razão de risco)  
i.a. - Ingrediente ativo  
MC - Medição da distância da cabeça  
MI - Medição da distância intertegular  
MN - Tricrômico de Masson  
MY - Tricrômico de Mallory  
PAS - Ácido Periódico de Schiff  
PB - Pupa de olho branco  
PM - Pupa de olho marrom  
PP - Pupa de olho preto  
PR - Pupa de olho rosa  
SL - Secção longitudinal  
LECA - Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas  
ST - Secção transversal  
UV - Ultravioleta

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....   | 1         |
| 2. OBJETIVO.....   | 3         |
| 2.1 Objetivos gerais.....  | 3         |
| 2.2 Objetivos específicos.....   | 3         |
| 3. ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS.....   | 4         |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 5         |
| <b>CAPÍTULO 1.....</b>   | <b>8</b>  |
| Efeitos da exposição subletal ao clorantraniliprole no desenvolvimento larval e na morfometria de <i>Scaptotrigona postica</i> (Latreille, 1807).....                          | 8         |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 10        |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS.....  | 12        |
| 2.1 Coleta do material biológico.....  | 12        |
| 2.2 Inseticida e concentrações.....  | 12        |
| 2.3 Bioensaios de exposição.....   | 14        |
| 2.4 Morfometria.....   | 15        |
| 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 16        |
| 4. RESULTADOS.....   | 17        |
| 4.1 Validação dos bioensaios.....  | 17        |
| 4.2 Taxas de mortalidade, pupação, emergência e desenvolvimento.....   | 17        |
| 4.3 Morfometria.....   | 23        |
| 5. DISCUSSÃO.....  | 24        |
| 6. CONCLUSÃO.....  | 29        |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 30        |
| <b>CAPÍTULO 2.....</b>   | <b>35</b> |
| Efeitos da exposição subletal ao clorantraniliprole na formação da musculatura de voo de <i>Scaptotrigona postica</i> (Latreille, 1807) por meio de análises histológicas..... | 36        |
| 1 INTRODUÇÃO.....  | 38        |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS.....   | 40        |
| 2.1 Delineamento experimental e validação dos bioensaios.....  | 40        |
| 2.2 Maturação das abelhas emergentes.....  | 40        |
| 2.3 Análise histológica com Hematoxilina e Eosina e complementares.....  | 41        |
| 2.3.1 Coloração Ácido Periódico de Schiff.....   | 42        |
| 2.3.2 Hematoxilina e Eosina contra corada com Azul de metileno em resina.....  | 43        |
| 2.3.3 Protocolo em inclusão em parafina.....   | 43        |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.4 Coloração Tricrômico de Mallory em parafina.....                        | 44 |
| 2.3.5 Coloração Tricrômica de Masson em parafina.....                         | 44 |
| 2.4 Medição dos núcleos das células musculares.....                           | 45 |
| 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....   | 46 |
| 4. RESULTADOS.....  | 46 |
| 4.1 Validação dos bioensaios.....   | 46 |
| 4.2 Análise histológica do músculo de voo em hematoxilina e eosina.....       | 46 |
| 4.2.2 Coloração com Ácido Periódico de Schiff.....                            | 48 |
| 4.2.3 Hematoxilina e Eosina contra corada com Azul de metileno em resina..... | 50 |
| 4.2.4 Coloração Tricrômico de Mallory em parafina.....                        | 52 |
| 4.2.5 Coloração Tricrômico de Masson em parafina.....                         | 53 |
| 4.3 Medições da área dos núcleos celulares nas lâminas histológicas.....      | 54 |
| 5. DISCUSSÃO.....   | 55 |
| 6. CONCLUSÃO.....   | 59 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 59 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....  | 65 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas representam o grupo de polinizadores mais abundante no meio ambiente, visitando mais de 90% dos principais cultivos e polinizando 48% das plantas cultivadas que estão diretamente ligadas à alimentação humana (BPBES, 2019). Em especial, as abelhas sem ferrão são polinizadoras essenciais para diversas espécies vegetais em ecossistemas tropicais e subtropicais, além de contribuírem para a polinização de culturas agrícolas de grande valor econômico (CHAN *et al.*, 2019).

No Brasil, apesar da grande diversidade de espécies de abelhas, as sem ferrão enfrentam um rápido declínio populacional, devido a fatores como o desmatamento de florestas nativas (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010), competição com espécies exóticas (WILMS; WIECHERSE, 1997) e, sobretudo, o uso intensivo de agrotóxicos na agricultura. Essa contaminação ambiental afeta diretamente a saúde das colônias, podendo comprometer o desenvolvimento do ciclo de vida e a longevidade dos indivíduos (CHAN; RAINE, 2021).

O comportamento de forrageamento das abelhas corbiculadas, caracterizado pela busca por recursos como néctar e pólen, eleva sua vulnerabilidade à exposição aos agrotóxicos (ENGEL; RASMUSSEN, 2020), devido ao maior risco de contato com resíduos em ambientes agrícolas (CAMPANA; SOUZA; HARTFELDER, 2023). Esses contaminantes, ao serem levados para a colônia, comprometem tanto as abelhas adultas quanto os estágios iniciais do desenvolvimento, afetando as larvas nos discos de cria (TOMÉ *et al.*, 2020; WEN *et al.*, 2021).

Entre 2000 e 2018, o Brasil registrou um aumento de 45% nas áreas destinadas à produção agrícola (BRASIL/IBGE, 2020). Esse crescimento tem sido acompanhado por uma intensificação no uso de agrotóxicos. Em 2018, foram pulverizados cerca de 1,2 bilhão de litros de agrotóxicos, dos quais 15% foram classificados como extremamente tóxicos (PIGNATI *et al.*, 2022). Para esses produtos classificados como “Químicos e Bioquímicos”, as vendas totalizaram 800.652 toneladas de ingredientes ativos (i.a.), caracterizando um aumento de 11% em relação ao ano anterior (2021) (IBAMA, 2022).

Dentre esses agrotóxicos utilizados na agricultura, os inseticidas pertencentes à classe das diamidas antranílicas foram os primeiros a serem comercializados (QI; CASIDA, 2013; KADALA, 2019). Esses compostos, que integram as subclasses antranílica e ftálica (SATTELLE; CORDOVA; CHEEK, 2008), atuam especificamente sobre os receptores de

rianodina (RyR), que são grandes canais iônicos localizados no retículo sarcoplasmático e no retículo endoplasmático dos neurônios dos insetos (SATTELLE; CORDOVA; CHEEK, 2008). A ativação desses receptores promove a liberação de íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (LAHM; CORDOVA; BARRY, 2009), que é fundamental em diversos processos biológicos, como a contração muscular, divisão celular, reparo da membrana celular, secreção hormonal e expressão gênica em praticamente todos os tipos de células (COLLET *et al.*, 2021).

O inseticida à base de clorantianiliprole (CL) é amplamente utilizado em diversas culturas agrícolas, como arroz, café e outras (FMC, 2021), que atraem e recebem muitos visitantes florais e polinizadores ao longo da suas florações (BPBES, 2019). A forma de aplicação recomendada para esse inseticida varia conforme a cultura, podendo ser realizada por meio terrestre, dispersão aérea ou pela pulverização por pivô central (FMC, 2021). A exposição dos insetos ao clorantianiliprole provoca uma sintomatologia característica, incluindo cessação rápida da alimentação, letargia, paralisia parcial e, em alguns casos, regurgitação (CÓRDOVA *et al.*, 2006).

Como agravante, a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar destacou que o clorantianiliprole apresenta alta persistência no meio ambiente (EFSA, 2013). De acordo com Kavallieratos e colaboradores (2024), o clorantianiliprole surgiu como uma solução promissora para o controle de pragas agrícolas devido à sua seletividade em relação a organismos não alvo (KAVALLIERATOS *et al.*, 2024), além de ser designado como agrotóxico de risco reduzido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA, 2008)

No entanto, embora o clorantianiliprole seja considerado de baixo risco, ainda são necessárias mais investigações sobre seus efeitos em organismos não alvo. A maioria dos estudos sobre os impactos dos agrotóxicos em abelhas concentra-se na fase adulta desse inseto, tendo como modelo principal a espécie *Apis mellifera* (CARVALHO *et al.*, 2009; FERNANDEZ; CRUZ-LANDIM; MALASPINA, 2012). Apesar de se encontrar mais testes com esta espécie, o Brasil se destaca quanto ao número de espécies nativas de abelhas sociais (MENEZES *et al.*, 2023). Desta forma, também deve ser levantada a preocupação quanto aos efeitos dos agrotóxicos sobre estes organismos.

Considerando o aumento do uso de agrotóxicos na agricultura e a relevância das abelhas para a polinização e a produtividade agrícola, torna-se cada vez mais necessário realizar testes de toxicidade para identificar possíveis efeitos em organismos não-alvo (FISCHER; MILTON; WALLACE, 2020; GOMES *et al.*, 2023). Esses estudos permitem avaliar os riscos de agravamento das condições ambientais e o prejuízo sobre os serviços

ambientais de polinização. Além disso, os resultados por meio dessas pesquisas tornam-se relevantes quando divulgados no meio científico e são essenciais para as agências regulatórias, pois possibilitam a realização de novas avaliações de risco e a implementação de medidas de mitigação ou de restrições, visando maior segurança ambiental e na saúde pública.

Neste contexto, as avaliações do impacto dos agrotóxicos sobre as abelhas podem contribuir com o cumprimento dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS), estabelecidos na Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, adotada em 2015 pelos países membros da Organização das Nações Unidas (ONU). De forma direta ou indireta, estas pesquisas alinham-se aos objetivos 2 - "Fome zero e agricultura sustentável", 12 - "Consumo e produção responsáveis", 13 - "Ação contra a mudança global do clima" e 15 - "Vida terrestre" (ONU, 2015).

Diante da problemática do uso intensivo de agrotóxicos na agricultura e a falta de informações em relação ao efeito subletal durante o desenvolvimento larval, especialmente em abelhas sem ferrão, este estudo teve como objetivo avaliar se abelhas da espécie *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), expostas ao ingrediente ativo clorantraniliprole durante a fase larval, apresentam alterações no desenvolvimento, na morfometria das abelhas emergentes e na formação da musculatura de voo.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivos gerais**

Este estudo teve como objetivo geral avaliar se abelhas da espécie *S. postica* expostas ao clorantraniliprole durante a fase larval apresentam alterações no desenvolvimento, na morfometria e na integridade da musculatura de voo de indivíduos adultos recém-emergidos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos do Capítulo 1 deste estudo foram:

- Avaliar o desenvolvimento das larvas expostas ao ingrediente ativo clorantraniliprole em condições *in vitro*, por meio da avaliação da taxa de crescimento, defecação, pupação, emergência e mortalidade.
- Avaliar se a exposição oral das larvas ao alimento, combinado com o ingrediente ativo clorantraniliprole, afeta a morfometria da largura da cabeça e distância intertegular das abelhas adultas recém-emergidas.

Os objetivos específicos do Capítulo 2 deste estudo foram:

- Avaliar os efeitos da exposição das larvas ao ingrediente ativo clorantraniliprole sobre a musculatura de voo por meio de análises histomorfológicas.
- Caracterizar as estruturas circulares observadas nas lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina, por meio de outras análises histoquímicas utilizando de colorações de Ácido Periódico de Schiff, Azul de Metileno, Tricrômico de Masson e Tricrômico de Mallory.
- Avaliar quantitativamente as alterações no tamanho dos núcleos celulares observadas durante as análises qualitativas das lâminas histológicas, por meio da medição da área nuclear em secções longitudinais.

### **3. ESTRUTURAÇÃO DOS CAPÍTULOS**

A dissertação está organizada em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda os efeitos do ingrediente ativo clorantraniliprole no desenvolvimento larval de *S. postica* em condições *in vitro*. Nele, são apresentados dados sobre taxas de desenvolvimento das abelhas expostas ao ingrediente ativo clorantraniliprole abordando os estágios de defecação, pupação conforme a coloração dos olhos, emergência e a contagem das mortes durante o período total de desenvolvimento das abelhas, além de análises morfométricas da largura da cabeça e distância intertegular das abelhas adultas recém-emergidas.

O segundo capítulo explora os impactos da exposição larval ao ingrediente ativo clorantraniliprole na musculatura de voo das abelhas, por meio de análises histomorfológicas. Para isso, foram utilizadas técnicas de inclusão em resina e parafina, permitindo a obtenção de secções histológicas para avaliação detalhada da morfologia muscular. Além da coloração usual com Hematoxilina e Eosina, foram empregadas colorações histoquímicas específicas, como Ácido Periódico de Schiff, Tricrômico de Masson, Tricrômico de Mallory e Azul de Metileno, visando a identificação de fibras musculares, fibras colágenas e outras estruturas teciduais.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BPBES. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. 1 ed. São Carlos/SP: Editora Cubo, 1 ed., p. 1-93, 2019. <http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>

BRASIL - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Monitoramento da cobertura e uso da terra do Brasil: 2016 - 2018**. Rio de Janeiro/RJ: IBGE, 2020. 26 p. <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=2101703>

CAMPANA, L.; SOUZA, L. D. R.; HARTFELDER, K. A genética da organização social das abelhas. **Genética na Escola**, v. 18, n. 2, 2023. <https://doi.org/10.55838/1980-3540.ge.2023.511>

CARVALHO, S. M. *et al.* A maioria dos trabalhos relacionados aos efeitos de pesticidas sobre abelhas têm considerado a fase adulta dos insetos, usando como modelo principalmente a espécie *Apis mellifera*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 597-606, 2009. <https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p5972009>.

CHAN, D. S. W.; RAINE, N. E. Population decline in a ground-nesting solitary squash bee (*Eucera pruinosa*) following exposure to a neonicotinoid insecticide treated crop (*Cucurbita pepo*). **Scientific Reports**, v. 11, n. 4241, 2021. 10.1038/s41598-021-83341-7.

CHAN, D. S. W. *et al.* Assessment of risk to hoary squash bees (*Peponapis pruinosa*) and other ground-nesting bees from systemic insecticides in agricultural soil. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1870, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47805-1>

CÓRDOVA, D. *et al.* Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 1, p. 196–214, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>.

COLLET, C. *et al.* Elementary calcium release events in the skeletal muscle cells of the honey bee *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96028-w>.

EFSA. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance chlorantraniliprole. **EFSA Journal**, v. 11, ed. 6, p. 1–107, 2013. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.3143>

ENGEL, M. S.; RASMUSSEN, C. Corbiculate Bees. In: Starr, C. (eds) *Encyclopedia of Social Insects*. **Springer**, p. 1-9, 2020. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-90306-4\\_30-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-90306-4_30-1)

FERNANDEZ, F. C.; CRUZ-LANDIM, C.; MALASPINA, O. Influence of the Insecticide Pyriproxyfen on the Flight Muscle Differentiation of *Apis Mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 844-848, 2012. <https://doi.org/10.1002/jemt.22003>

FISCHER, I.; MILTON, C.; WALLACE, H. Toxicity testing is evolving!. **Toxicology Research**, v. 9, n. 2, p. 67–80, 2020. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa011>

FMC. [Bula]. Grânulos Dispersíveis em Água (WG) . Campinas, FMC Química do Brasil Ltda., 29 de março de 2021.  
<https://fmcagricola.com.br/Content/Fotos/Bula%20-%20Altacor.pdf>.

GOMES, I. N. *et al.* The survival and flight capacity of commercial honeybees and endangered stingless bees are impaired by common agrochemicals. **Ecotoxicology**, v. 32, p. 937-947, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02699-8>

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos: sobre os relatórios de comercialização de agrotóxicos**, 2022.  
<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. Bees, ecosystem services and the Brazilian Forest Code. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, 2010.  
<https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000400008>

KADALA, A. *et al.* Honey bees long-lasting locomotor deficits after exposure to the diamide chlorantraniliprole are accompanied by brain and muscular calcium channels alterations. **Scientific Reports**, v. 9, n. 2153, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39193-3>

KAVALLIERATOS, N.G. *et al.* Sublethal Effects of Chlorantraniliprole on the Mobility Patterns of *Sitophilus* spp.: Implications for Pest Management. **Insects**, v.15, n. 451, 2024.  
<https://doi.org/10.3390/insects15060451>

LAHM, G. P.; CORDOVA, D.; BARRY, J. D.. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.018>

MENEZES, C. *et al.* Abelhas sem ferrão relevantes para a meliponicultura no Brasil [livro eletrônico]. **Associação Brasileira de Estudos das Abelhas (A.B.E.L.H.A)**, ed. 1, p. 1-98, 2023.

ONU - Organização das Nações Unidas. **Agenda 2030 - ODS - Objetivos de desenvolvimento sustentável**, 2015. <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>.

PIGNATI, W. A. O caráter pandêmico dos desastres socioambientais e sanitários do agronegócio. **Saúde em Debate**, v. 46, n. 2, p. 467-481, 2022.  
<https://doi.org/10.1590/0103-11042022E231>

QI, S.; CASIDA, J. E. Species differences in chlorantraniliprole and flubendiamide insecticide binding sites in the ryanodine receptor. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, p. 321-326, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.09.004>

SATTELLE, D. B., CORDOVA, D., CHEEK, T.R. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invert Neurosci**, v. 8, n. 107, 2008.  
<https://doi.org/10.1007/s10158-008-0076-4>

TOMÉ, H. V. V. *et al.* Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. **Environmental Pollution**, v. 256, n. 113420, 2020.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113420>

US-EPA - United States Environmental Protection Agency. **Pesticide Fact Sheet:**  
Chlorantraniliprole. 2008.  
[www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-090100\\_01-Apr-08.pdf](http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-090100_01-Apr-08.pdf)

WEN, X. *et al.* Pesticide residues in the pollen and nectar of oilseed rape (*Brassica napus* L.) and their potential risks to honey bees. **Science of The Total Environment**, v. 786, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147443>

WILMS, W.; WIECHERS, B. Floral resource partitioning between native *Melipona* bees and the introduced Africanized honey bee in the Brazilian Atlantic rain forest. **Apidologie**, v. 28 , p. 339 – 355, 1997. <https://doi.org/10.1051/apido:19970602>

## CAPÍTULO 1

### Efeitos da exposição subletal ao clorantraniliprole no desenvolvimento larval e na morfometria de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807)

#### RESUMO

As abelhas sem ferrão (Meliponini) são polinizadores essenciais, mas o uso de agrotóxicos ameaça suas populações. O clorantraniliprole, inseticida da classe das diamidas antranílicas, atua nos receptores de rianodina, alterando a homeostase do cálcio e comprometendo funções fisiológicas nos insetos. Apesar de seus efeitos serem conhecidos em adultos de *Apis mellifera*, há poucos dados sobre seu impacto em larvas de abelhas sem ferrão. Nesse contexto, o presente estudo avaliou se larvas de *Scaptotrigona postica*, expostas ao clorantraniliprole, apresentam alterações no desenvolvimento e na morfometria das abelhas emergentes. Foram testados cinco tratamentos: controle negativo (CN) (apenas alimento), positivo (CP) (dimetoato - 6,9 ng i.a./larva), controle do solvente (CA) (acetona - 0,2%), e duas concentrações subletais de clorantraniliprole (CL1 - 2,04 ng i.a./larva e CL2 - 0,204 ng i.a./larva), estabelecidas pelo BeeRex. As larvas foram mantidas em placas acrílicas estéreis, em estufa BOD a 30°C, com controle manual de umidade. O desenvolvimento foi monitorado diariamente quanto aos estágios de quinto ínstar (5°I), defecação (DF), pupação conforme a coloração dos olhos: branco (PB), rosa (PR), marrom (PM) e preto (PP) e emergência (EM). Foram registradas taxas de mortalidade, pupação e emergência, além de mensuração da largura da cabeça (MC) e distância intertegular (MI) das abelhas emergentes. Os resultados de mortalidade larval, taxa de pupação e emergência indicaram que apenas o tratamento CP induziu toxicidade significativa. Comparando-se as taxas de mortalidade em relação a um estágio anterior de desenvolvimento, observou-se variação significativa em CL2, com um aumento de mortalidade de PB para DF, e de PM para PR. Entre os períodos de EM e o 5°I, observou-se que os tratamentos CA e CL2 apresentaram diferenças significativas, indicando que a exposição não afeta o início do desenvolvimento, mas pode reduzir a prole da colônia na fase de EM. A curva de Kaplan-Meier facilitou a visualização da influência do clorantraniliprole no desenvolvimento das larvas de *S. postica*, enquanto o teste Log-Rank de Mantel-Cox revelou diminuição significativa na probabilidade de sobrevivência para larvas expostas ao CL2. As análises morfométricas mostraram aumento significativo na largura da cabeça em CL1 e na distância intertegular em CL2. Conclui-se que, embora as concentrações testadas não tenham induzido toxicidade sobre a mortalidade larval, taxa de pupação e a emergência, a concentração CL2 impactou a sobrevivência entre estágios específicos do desenvolvimento larval e reduziu a expectativa de vida das abelhas emergentes. Além disso, ambas as concentrações testadas afetaram a morfometria externa.

**Palavras-chave:** Abelha sem ferrão, desenvolvimento larval, mortalidade, pupação, morfometria.

## ABSTRACT

Stingless bees (Meliponini) are essential pollinators, but the use of pesticides threatens their populations. Chlorantraniliprole, an insecticide from the anthranilic diamide class, targets ryanodine receptors, disrupting calcium homeostasis and impairing physiological functions in insects. Although its effects are known in adult *Apis mellifera*, data on its impact on stingless bee larvae remain scarce. In this context, the present study evaluated whether *Scaptotrigona postica* larvae exposed to chlorantraniliprole exhibit alterations in development and in the morphometry of emerging bees. Five treatments were tested: negative control (CN) (diet only), positive control (CP) (dimethoate – 6.9 ng a.i./larva), solvent control (CA) (acetone – 0.2%), and two sublethal concentrations of chlorantraniliprole (CL1 – 2.04 ng a.i./larva and CL2 – 0.204 ng a.i./larva), established by BeeRex. Larvae were maintained in sterile acrylic plates in a BOD incubator at 30°C with manual humidity control. Development was monitored daily based on the following stages: fifth instar (5<sup>o</sup>I), defecation (DF), pupation according to eye coloration white (PB), pink (PR), brown (PM), and black (PP) and emergence (EM). Mortality, pupation, and emergence rates were recorded, as well as measurements of head width (MC) and intertegular distance (MI) in emerged bees. Larval mortality, pupation, and emergence rates indicated that only the CP treatment induced significant toxicity. When comparing mortality rates relative to an earlier developmental stage, significant variation was observed in CL2, with increased mortality from PB to DF and from PM to PR. Between the EM and 5<sup>o</sup>I periods, significant differences were observed in the CA and CL2 treatments, indicating that exposure does not affect the onset of development but may reduce colony offspring at the EM stage. The Kaplan-Meier curve facilitated visualization of chlorantraniliprole's influence on the development of *S. postica* larvae, while the Mantel-Cox Log-Rank test revealed a significant reduction in survival probability for larvae exposed to CL2. Morphometric analyses showed a significant increase in head width in CL1 and in intertegular distance in CL2. In conclusion, although the tested concentrations did not induce toxicity regarding larval mortality, pupation rate, or emergence, CL2 affected survival between specific larval developmental stages and reduced the life expectancy of emerged bees. Furthermore, both tested concentrations affected external morphometry.

**Keywords:** Stingless bee, larval development, mortality, pupation, morphometry.

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos holometábolos, ou seja, apresentam o desenvolvimento na fase de ovo, larva, pupa e adultos (CRUZ-LANDIM, 2009; MANTHEY, 2022). Nas abelhas sem ferrão, as operárias iniciam o processo de desenvolvimento das larvas com a construção das células de cria. Essas células são preenchidas com uma mistura nutritiva composta por secreções glandulares, mel e pólen. Posteriormente, a rainha deposita um ovo em cada célula, que é imediatamente selada pelas operárias e permanece fechada até a emergência da abelha adulta (BOTINA *et al.*, 2020; CAMPANA, SOUZA, HARTFELDER; 2023; MENEZES *et al.*, 2023).

A abelha sem ferrão *Scaptotrigona postica* (Apidae: Meliponini), é conhecida popularmente como "abelha mandaguari" ou "abelha canudo", e apresenta hábitos de nidificação em troncos ocos de árvores (MENEZES *et al.*, 2023). Nas colônias, os favos de cria são construídos horizontalmente e sobrepostos, edificados com cerume. A organização da colônia é composta por uma rainha e, em média, 8 mil operárias que desempenham suas funções em benefício da colônia (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002; ROSA-FONTANA *et al.*, 2020; MENEZES *et al.*, 2023).

A polinização realizada pelas abelhas é um serviço ambiental fundamental para a manutenção da biodiversidade e para a produção agrícola, contribuindo diretamente para o rendimento de aproximadamente 75% das principais culturas globais (BARBOSA *et al.* 2017; HIPÓLITO; BOSCOLO; VIANA, 2018). No caso do café (*Coffea arabica*), polinizado por espécies como a *S. postica*, os polinizadores podem aumentar a produtividade em média em 31%, sendo essa a segunda cultura de maior valor anual de produção (BPBES, 2019).

Contudo, durante a polinização, as abelhas entram em contato com diversos agrotóxicos aplicados na agricultura. Ao coletarem recursos florais, armazenam pólen potencialmente contaminado em suas corbículas e o transportam para a colônia. Como esse pólen compõe parte do alimento larval, tanto as abelhas adultas quanto as larvas ficam expostas aos resíduos tóxicos, comprometendo a saúde da colônia (TOMÉ *et al.*, 2020; WEN *et al.*, 2021). Esse processo de contaminação contribuiu diretamente para o declínio da população de abelhas (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010).

Entre os agrotóxicos utilizados na agricultura, destaca-se o inseticida à base de clorantraniliprole (CL) (FMC, 2021). Reconhecida como uma nova classe de inseticidas (CÓRDOVA, 2006), as diamidas antranílicas conquistaram, em 2018, a terceira maior participação nas vendas globais, correspondendo a 12% do mercado de inseticidas (DOS

SANTOS *et al.*, 2024). A forma de aplicação do clorantraniliprole varia conforme a cultura agrícola (FMC, 2021) e, por ser um inseticida sistêmico, pode expor insetos não alvos, como as abelhas, durante o forrageamento (MUNDY-HEISZ; PROSSER; RAINE, 2022).

Do ponto de vista fisiológico, o clorantraniliprole atua ativando os receptores de rianodina (RyR), canais responsáveis pela liberação do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), elemento essencial para a contração muscular. Sua ação causa a liberação excessiva dos estoques internos de  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando desequilíbrio na homeostase celular. Esse desbalanço resulta em disfunções musculares, levando à cessação da alimentação, letargia, paralisia parcial e, ocasionalmente, regurgitação (CÓRDOVA *et al.*, 2006).

Como agravante, foi demonstrado que o clorantraniliprole não causa efeito repelente sobre as abelhas, permitindo que esses insetos colete pólen e néctar contaminados (GOMES *et al.*, 2020). Essa via de exposição foi confirmada por Chan *et al.* (2019), que detectaram resíduos do clorantraniliprole em amostras de pólen coletadas por abelhas que nidificam em solo.

Essas evidências aumentam as preocupações quanto aos efeitos dos agrotóxicos sobre as abelhas sem ferrão, uma vez que a maioria dos estudos sobre os efeitos de agrotóxicos sobre abelhas concentra-se na fase adulta, utilizando, principalmente, a espécie *Apis mellifera* como organismo modelo (CARVALHO *et al.*, 2009; FERNANDEZ; CRUZ-LANDIM; MALASPINA, 2012). O Brasil, entretanto, se destaca quanto ao número de espécies nativas de abelhas sem ferrão, com 259 espécies registradas (NOGUEIRA *et al.*, 2023). Além disso, estudos têm demonstrado que as abelhas sem ferrão são mais sensíveis aos agrotóxicos do que outros grupos, como abelhas solitárias e melíferas, conforme evidenciado pela meta-análise de Arena e Sgolastra (2014) e por dados de Lourencetti *et al.* (2023), o que reforça a necessidade de investigações específicas voltadas a esse grupo.

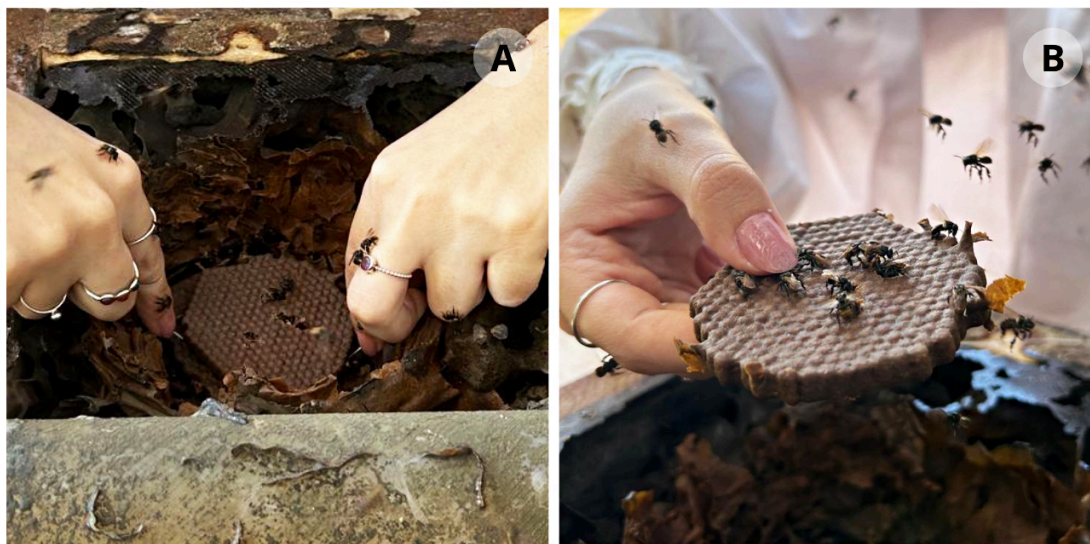
Considerando o desenvolvimento larval das abelhas sem ferrão e o uso de agrotóxicos na agricultura, os testes de toxicidade tornam-se cada vez mais necessários para identificar possíveis efeitos subletais em diferentes estágios do desenvolvimento desses insetos (FISCHER; MILTON; WALLACE, 2020; GOMES *et al.*, 2023). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar se a exposição de larvas de *S. postica* (Latreille, 1807) ao ingrediente ativo clorantraniliprole induz alterações no desenvolvimento e na morfometria de abelhas adultas emergentes.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material biológico

Discos de cria de colônias não parentais de *S. postica* foram coletados no meliponário do Grupo de Pesquisa Abelhas e os Serviços Ambientais (ASAs), localizado no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Campus Araras/SP, Brasil (22°18'22.9"S 47°22'53.1"W) no mês de janeiro de 2024. Discos contendo ovos e larvas de primeiro ínstar foram coletados com auxílio de fio dental (Figuras 1A e 1B), armazenados em placas de Petri, acondicionadas em caixas de isopor e, posteriormente, levados ao Laboratório de Polinizadores e ao Laboratório de Bioensaios. Destes discos, foram obtidos o alimento larval e as larvas.

**Figura 1.** Coleta dos discos de cria no meliponário do grupo ASA's.



(A) Separação do primeiro disco com auxílio de fio dental. (B) Disco recém-retirado da colônia. Fonte: Autoria própria, 2024.

### 2.2 Inseticida e concentrações

Os bioensaios foram compostos por cinco tratamentos experimentais: I) Controle negativo (CN - alimento puro); II) Controle positivo (CP - alimento + dimetoato) (Cayman Chemical Company, EUA, padrão analítico, número CAS 60-51-5, pureza  $\geq 98,0\%$ ); III) Controle do solvente (CA - alimento + acetona); IV) e duas concentrações do ingrediente ativo Clorantraniliprole (Sigma-Aldrich, Alemanha, padrão analítico, número CAS 500008-45-7, pureza  $\geq 95,0\%$ ): CL1 (alimento + concentração 1) e V) CL2 (alimento + concentração 2).

Para o CN, apenas o alimento larval fresco (Figura 2) foi utilizado. Para o CP, foi utilizado o alimento suplementado com 6,899 ng i.a./larva do ingrediente ativo dimetoato (ROSA-FONTANA *et al.*, 2020), visto que esta validação é importante para garantir que o sistema e as condições do ensaio sejam respondentes e confiáveis, conforme determinado na diretriz nº 237 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2013).

**Figura 2.** Alimento larval fresco extraído dos discos de cria coletados.



Fonte: Autoria própria, 2024.

Como o ingrediente ativo clorotraniliprole não é solúvel em água, ele foi solubilizado em acetona para obter uma solução estoque de 0,2% de acetona, que foi posteriormente homogeneizada com o alimento larval (HAAS *et al.*, 2021; VINEETHA; CHELLAPPAN; PATHROSE, 2022). Desse modo, o CA foi utilizado para identificar se o solvente utilizado possui algum grau de toxicidade para a espécie de abelha sem ferrão.

Para determinar os níveis residuais do ingrediente ativo clorotraniliprole no pólen e néctar das flores, foi escolhida a cultura do café, cuja dose indicada para aplicação em campo é de 90,0 g/ha (FMC, 2021), comumente utilizada para controlar o bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*) (Guérin-Méneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae) (ALMEIDA *et al.*, 2020) uma das principais pragas da cultura do café (FMC, 2021). Assim, esta dose foi inserida na tabela BeeRex, desenvolvida pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA, 2015), e as concentrações subletais correspondentes foram determinadas em 2,04 (CL1) e 0,204 ng i.a./larva (CL2).

### 2.3 Bioensaios de exposição

No laboratório, as larvas e os favos de cria com o alimento permaneceram nas condições de umidade recomendadas por Dorigo *et al.* (2019), necessárias para evitar a desidratação das larvas e do alimento larval. Assim, para a realização da transferência das larvas, foi mantida a umidade ambiente acima de 75% por meio do uso de umidificador de ar.

Na transferência, foram utilizadas placas de acrílico específicas para desenvolvimento *in vitro* de larvas de abelhas sem ferrão. Elas foram desenvolvidas pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli (ASA's - UFSCar, Araras/SP), em conjunto com o grupo liderado pelo Prof. Dr. Osmar Malaspina (LECA - UNESP, Rio Claro/SP), sendo patenteadas pelo número de registro BR1020220011354 (ROSA-FONTANA *et al.*, 2022). Estas placas foram lavadas, esterilizadas em luz UV e adicionadas em placas de Petri descartáveis tampadas (1,5 x 20,0 cm).

Em cada um dos poços das placas acrílicas foram utilizados 25 µL de cada tratamento homogeneizado com o alimento, valor estabelecido por Dorigo *et al.* (2019). As larvas foram transferidas com o auxílio de uma agulha apícola, estabelecendo-se 30 larvas por placa e três réplicas por tratamento, totalizando 90 larvas por tratamento.

Após as transferências, as placas foram levadas para a incubadora B.O.D. (Figura 3), onde permaneceram sob temperatura de 30°C durante todo o experimento (ENGELS; ROSENKRANZ; ENGELS, 1995; VOLLET-NETO; MENEZES; IMPERATRIZ-FONSECA, 2015).

**Figura 3.** Exposição das larvas *S. postica* aos tratamentos nas placas de acrílico.



Fonte: Autoria própria, 2024.

A umidade relativa da B.O.D. foi controlada com o auxílio de um termohigrômetro digital, seguindo o método de Rosa-Fontana e colaboradores (2022). Inicialmente, foi mantida uma umidade próxima de  $95\pm 5\%$ , por meio da adição de 40 mL de água destilada nas placas de Petri descartáveis, além de potes plásticos contendo água destilada dentro da B.O.D.. Após 72 horas, a umidade foi reduzida para 85% por meio da adição e solubilização de 1 g de KCl em 40 mL de água destilada, substituindo o que já havia nas placas de Petri. Depois de 120 horas, a umidade foi reduzida para 75% por meio da adição de 0,5 mg de NaCl no volume de água remanescente nas placas; restaram 35 mL de água destilada, enquanto 5 mL evaporaram.

Para a avaliação do desenvolvimento das larvas, foram utilizados os parâmetros de Dorigo *et al.* (2019), descritos a seguir. Após a transferência das larvas dos favos de cria para as placas de acrílico, foram realizados registros quantitativos diários quanto ao ínstar larval, consumo de alimento, defecação, períodos de pupação, emergência e mortalidade dos indivíduos. Este acompanhamento durou aproximadamente 30 dias; tempo necessário para a emergência das abelhas, isto é, a saída completa de adultos dos poços de cria.

Para a validação dos bioensaios, seguiu-se a diretriz TG 237 da OECD (OECD, 2013). De acordo com esse protocolo, o tratamento com a substância de referência (controle positivo) deve resultar em uma mortalidade larval  $\geq 50\%$  até o 7º dia do experimento. Além disso, o controle negativo deve apresentar uma mortalidade larval cumulativa  $\leq 15\%$  entre o 4º e o 7º dia do teste, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos (OECD, 2013).

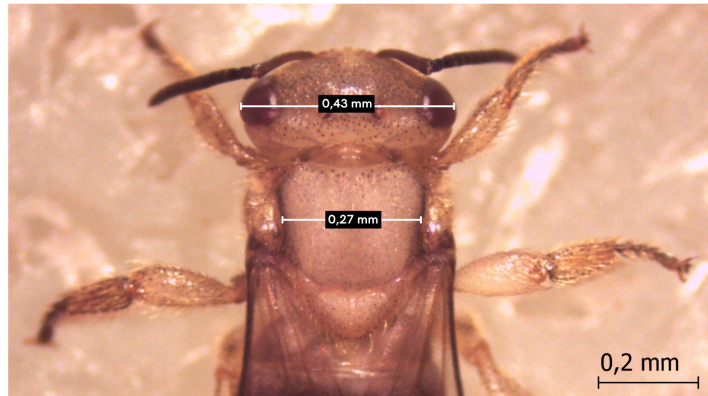
## **2.4 Morfometria**

Para a análise morfométrica, após a emergência, as abelhas foram mantidas por 72 horas em gaiolas e, sem seguida, foram anestesiadas em freezer, por 1 minuto a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, foram obtidas imagens dos indivíduos sob estereomicroscópio com câmera acoplada (Leica M 205 C) e software Leica Application Suite v4.8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). A partir do módulo de medição do software Fiji-ImageJ (v1.8.0, National Institutes of Health, Bethesda, EUA), foi realizada a medição da largura da cabeça e da distância intertegular, conforme descrito por Dorigo *et al.* (2019). Foram utilizadas 30 abelhas emergentes por tratamento.

Optou-se por medir a largura da cabeça e a distância intertegular devido à ação das diamidas antranílicas nos receptores de rianodina, localizados tanto no retículo sarcoplasmático quanto no retículo endoplasmático dos neurônios dos insetos (SATTELLE;

CORDOVA; CHEEK, 2008). Essa ação interfere na homeostase de cálcio, afetando o sistema motor e a atividade neural das abelhas (KADALA *et al.*, 2019; KADALA; CHARRETON; COLLET, 2020). Já a distância intertegular está diretamente relacionada à musculatura de voo, essencial para o forrageamento das operárias (DOS SANTOS *et al.*, 2024).

**Figura 4.** Medição da largura da cabeça e distância intertegular de abelhas *S. postica* criadas *in vitro*.



Fonte: Autoria própria, 2024.

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 9.0 (San Diego, Califórnia, EUA), considerando o nível de significância de 5%.

Para avaliar as taxas de mortalidade, pupação e emergência, foi verificada a normalidade dos dados de desenvolvimento pelo teste de D'Agostino & Pearson, optando-se por ANOVA/Tukey (para dados com distribuição normal) ou Kruskal-Wallis/Dunn (para dados sem distribuição normal). Esse método também foi utilizado para avaliar a taxa de mortalidade em cada fase do desenvolvimento e para avaliar as medições de largura da cabeça e distância intertegular. Além disso, foi realizado o teste T para comparar os dois tratamentos expostos ao clorantraniliprole (CL1 e CL2).

Em relação aos dados de mortalidade para todo o período de desenvolvimento (5º ínstar, defecação, pupa de olhos brancos, pupa de olhos rosas, pupa de olhos marrons, pupa de olhos pretos e emergência), foi realizada a construção de curvas de Kaplan-Meier, sendo comparadas pelos testes de Mantel-Cox (Log-rank) e Gehan-Breslow-Wilcoxon, ambos com nível de significância de 5%.

Ainda, para comparar os dados de mortalidade entre os estágios de desenvolvimento para um mesmo tratamento, foi realizada uma análise multivariada de variância pelo teste MANOVA/Tukey.

Para avaliar a morfometria da distância da largura da cabeça e intertegular, foi verificada a normalidade dos dados pelo teste de D'Agostino & Pearson, optando-se por ANOVA/Tukey (para dados com distribuição normal) ou Kruskal-Wallis/Dunn (para dados sem distribuição normal).

## 4. RESULTADOS

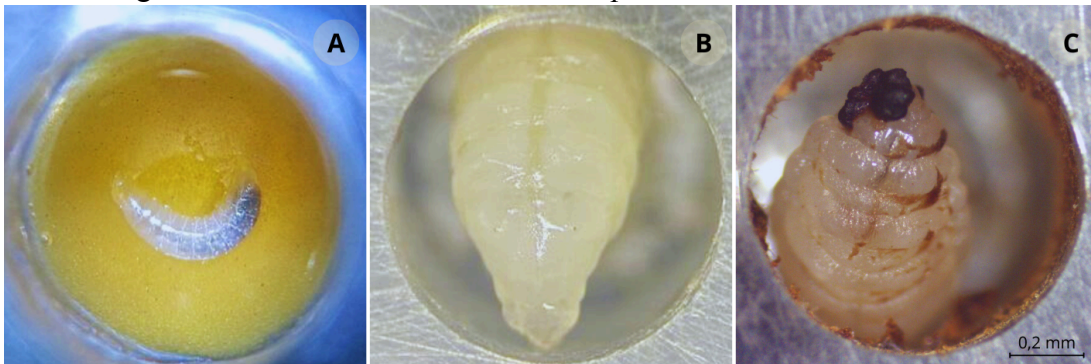
### 4.1 Validação dos bioensaios

No presente estudo, ambos os tratamentos CN e CP atenderam aos critérios estabelecidos pela OECD TG 237 (2013), garantindo a validação das condições experimentais, uma vez que o tratamento com a substância de referência (tratamento CP) apresentou uma mortalidade média de 53,33% no 7º dia do experimento. Além disso, o controle negativo (CN) registrou uma mortalidade média de 5,56% entre o 4º e o 7º dia.

### 4.2 Taxas de mortalidade, pupação, emergência e desenvolvimento

Os bioensaios realizados com as larvas permitiram o acompanhamento contínuo dos estágios de metamorfose das abelhas *S. postica* em condições laboratoriais controladas. Durante a fase larval, as larvas de 1º ínstar (Figura 5A) alimentaram-se até atingir o 5º ínstar (Figura 5B) e, em seguida, ocorreu a defecação, que marca o fim da alimentação e o início do desenvolvimento pré-pupal (Figura 5C).

**Figura 5.** Estágios de desenvolvimento larval de *S. postica*.

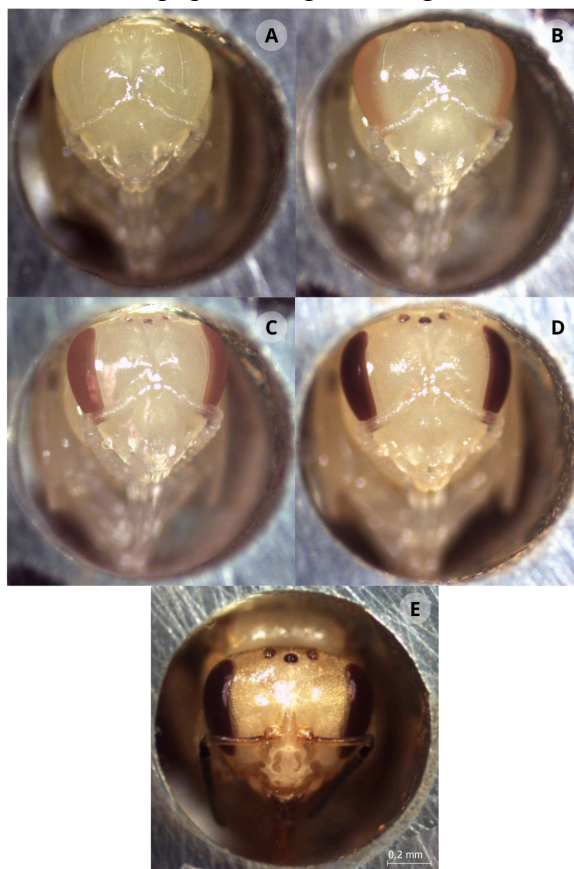


(A) Larva de 1º ínstar, 24h após a eclosão do ovo. (B) Larva de 5º ínstar. (C) Larva na fase de defecação. Fonte: Autoria própria, 2024.

Posteriormente, iniciou-se o processo de pupação, passando consecutivamente por quatro estágios, distintos pelas cores dos olhos. Os estágios foram pupa de olhos brancos

(Figura 6A), olhos rosados (Figura 6B), olhos marrons (Figura 6C) e olhos pretos (Figura 6D), seguida pela pré-emergência (Figura 6E).

**Figura 6.** Estágios de desenvolvimento pupal até a pré-emergência de *S. postica*



(A) Pupa de olhos brancos. (B) Pupa de olhos rosados. (C) Pupa de olhos marrons. (D) Pupa de olhos pretos. (E) Pré-emergência. Fonte: Autoria própria, 2024.

Os dados de mortalidade, pupação e emergência estão apresentados na Tabela 1. Em relação às taxas de mortalidade larval, não houve diferenças significativas entre os tratamentos CN, CA, CL1 e CL2, o que demonstrou ausência de toxicidade para a concentração de acetona, utilizada como solvente, e para as duas concentrações do clorantianiliprole. Ainda, segundo o teste T, os tratamentos referentes às duas concentrações do ingrediente ativo não foram diferentes estatisticamente entre si. Como esperado, o CP apresentou a maior taxa de mortalidade (92,22%).

Sobre as taxas de pupação, nota-se novamente que os tratamentos CN, CA, CL1 e CL2 não diferiram entre si, demonstrando não haver toxicidade para as duas concentrações do clorantianiliprole e nem da acetona. No entanto, o CP apresentou baixa taxa de pupação (15,56%), resultando em diferença significativa em comparação ao CN.

Por fim, para a taxa de emergência das abelhas, novamente é possível notar que CN, CA, CL1 e CL2 não apresentaram diferenças estatísticas. Assim como observado para as taxas de mortalidade e pupação, o CP apresentou diferença significativa obtendo a menor taxa de emergência (6,67%).

**Tabela 1** - Resultados de taxas de mortalidade, pupação e emergência de *S. postica* após exposição aos tratamentos.

| <b>Tratamentos</b> | <b>Mortalidade (%)</b>           | <b>Pupação (%)</b>               | <b>Emergência (%)</b>           |
|--------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <b>CP</b>          | <b>92,22 ± 5,09 <sup>▲</sup></b> | <b>15,56 ± 6,94 <sup>▲</sup></b> | <b>6,67 ± 6,67 <sup>▲</sup></b> |
| <b>CN</b>          | 38,89 ± 21,43                    | 76,67 ± 14,53                    | 60,00 ± 20,27                   |
| <b>CA</b>          | 58,89 ± 13,88                    | 71,11 ± 24,11                    | 37,78 ± 11,70                   |
| <b>CL1</b>         | 36,67 ± 24,04                    | 80,00 ± 26,03                    | 62,22 ± 22,69                   |
| <b>CL2</b>         | 58,89 ± 15,40                    | 46,67 ± 21,86                    | 41,11 ± 15,40                   |

Resultados apresentados como média e desvio padrão. CN: controle negativo; CP: controle positivo - dimetoato; CA: controle do solvente - acetona; CL1: clorantraniliprole concentração 1 (2,04 ng i.a./larva); CL2: clorantraniliprole concentração 2 (0,204 ng i.a./larva). Taxa de mortalidade: número de larvas mortas/número inicial de larvas; Taxa de pupação: número de pupas de olhos brancos/número inicial de larvas; Taxa de emergência/larvas: número de abelhas emergidas/número inicial de larvas. <sup>▲</sup> Indica diferença significativa quando comparado ao CN ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Dunnet). Fonte: Autoria própria, 2024.

Também foram analisadas variações de mortalidade entre os períodos de desenvolvimento durante o período completo do ensaio. Os marcos contabilizados foram quinto ínstar (5<sup>o</sup>I), defecação (DF), pupa de olhos brancos (PB), pupa de olhos rosados (PR), pupa de olhos marrons (PM), pupa de olhos pretos (PP) e a emergência (EM), como demonstrado na Tabela 2.

Analisando os resultados quanto à mortalidade em cada estágio de desenvolvimento, é possível observar que apenas o CP apresentou diferença estatística comparado com os demais tratamentos. Desse modo, tanto CL1 quanto CL2 apresentaram-se estatisticamente iguais aos tratamentos CN e CA (Tabela 2 <sup>▲</sup>).

Além disso, foi avaliada a diferença significativa em relação ao estágio anterior do mesmo tratamento. Em CN, CA e CL1 não houve diferença significativa entre os estágios. Entretanto, durante a transição de DF para PB e de PR para PM, observou-se uma diferença significativa, indicando influência do ingrediente ativo nessas duas etapas do desenvolvimento (Tabela 2 <sup>+</sup>).

Para concluir as análises de desenvolvimento baseadas em estágios, comparamos a emergência final (EM) com o estágio inicial de desenvolvimento, o 5ºI. Os resultados mostraram que CA e CL2 apresentaram diferenças significativas (Tabela 2 ●).

**Tabela 2** - Resultados de mortalidade acumulativa entre os diferentes estágios de desenvolvimento de *S. postica*, após exposição aos tratamentos.

| Trat. | Estágios de desenvolvimento  |                               |                               |                              |                               |                              |                              |
|-------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|       | 5ºI (%)                      | DF (%)                        | PB (%)                        | PR (%)                       | PM (%)                        | PP (%)                       | EM (%)                       |
| CP    | 53,33 ±<br>8,82 <sup>▲</sup> | 54,44 ±<br>10,72 <sup>▲</sup> | 84,44 ±<br>6,94 <sup>▲</sup>  | 88,89 ±<br>8,39 <sup>▲</sup> | 91,11 ±<br>5,09 <sup>▲</sup>  | 92,22 ±<br>5,09 <sup>▲</sup> | 93,33 ±<br>6,67 <sup>▲</sup> |
| CN    | 10,00 ±<br>5,77              | 14,44 ±<br>1,92               | 23,33 ±<br>14,53              | 27,78 ±<br>13,47             | 27,78 ±<br>13,47              | 33,33 ±<br>8,82              | 41,11 ±<br>19,53             |
| CA    | 4,44 ±<br>3,85               | 10,00 ±<br>10,00              | 28,89 ±<br>24,11              | 37,78 ±<br>16,44             | 50,00 ±<br>15,28              | 51,11 ±<br>13,47             | 58,89 ±<br>13,88 ●           |
| CL1   | 1,11 ±<br>1,92               | 5,56 ±<br>6,94                | 20,00 ±<br>26,03              | 27,78 ±<br>31,51             | 35,56 ±<br>25,46              | 35,56 ±<br>25,46             | 37,78 ±<br>22,69             |
| CL2   | 12,22 ±<br>13,47             | 14,44 ±<br>17,11              | 41,11 ±<br>13,88 <sup>+</sup> | 46,67 ±<br>17,32             | 57,78 ±<br>16,44 <sup>+</sup> | 57,78 ±<br>16,44             | 58,89 ±<br>15,40 ●           |

Resultados apresentados como média e desvio padrão. 5ºI: quinto ínstar; DF: defecação; PB: pupa de olhos brancos; PR: pupa de olhos rosados; PM: pupa de olhos marrons; PP: pupa de olhos pretos; EM: emergência. Trat.: tratamentos; CN: controle negativo; CP: controle positivo - dimetoato; CA: controle do solvente - acetona; CL1: clorantraniliprole concentração 1 (2,04 ng i.a./larva); CL2: clorantraniliprole concentração 2 (0,204 ng i.a./larva); <sup>▲</sup> Diferença significativa quando comparado ao CN da mesma fase de desenvolvimento ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Dunnet). ● Diferença significativa quando comparado ao 5ºI do mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey). <sup>+</sup> Diferença significativa quando comparado ao estágio anterior do mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ; ANOVA/Tukey). Fonte: Autoria própria, 2024.

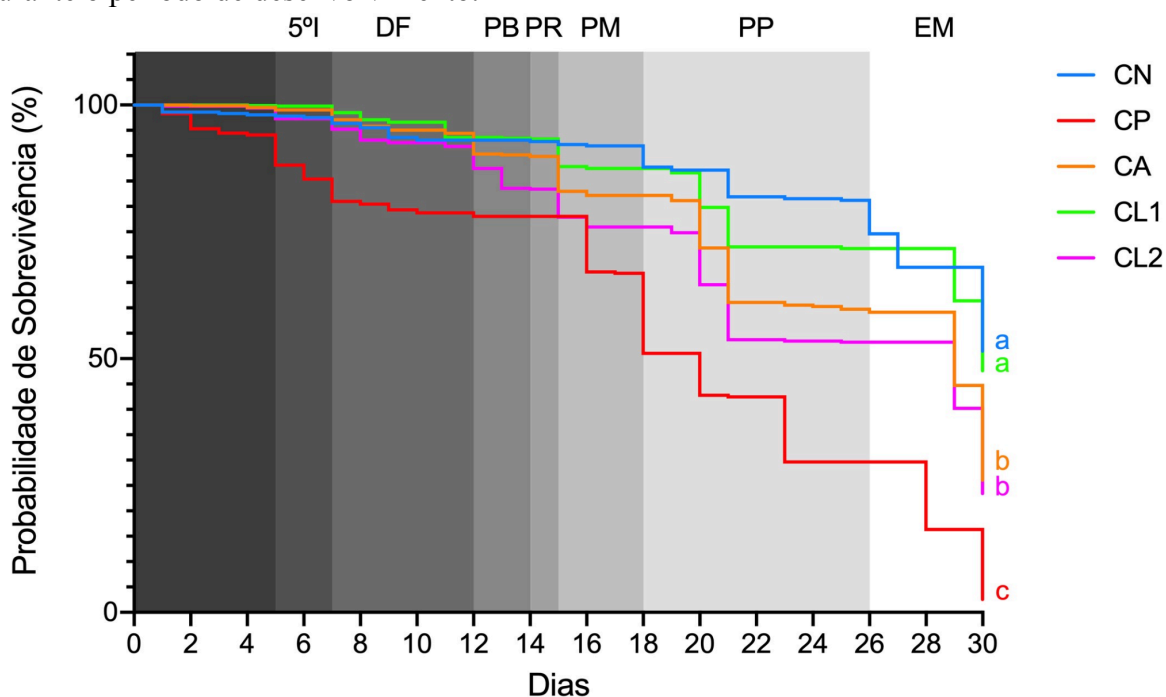
Para uma melhor demonstração dos tempos em cada estágio de desenvolvimento larval e pupal, até a emergência das abelhas, elaborou-se a curva de probabilidade de sobrevivência. Ela permite observar, em cada tratamento, os marcos temporais dos estágios de desenvolvimento. Esses marcos foram os mesmos apresentados anteriormente (5ºI, DF, PB, PR, PM, PP e EM), como demonstra a Figura 7.

A curva de sobrevivência foi comparada pelo teste Log-rank (Mantel-Cox), considerando todo o período de desenvolvimento, do início até a emergência das abelhas. É possível notar que CP, CA e CL2 diferiram estatisticamente de CN. No entanto, comparando

CA e CL2, vemos que não há diferença significativa, ou seja, ambos os tratamentos induzem diminuição significativa na probabilidade de sobrevivência.

Além disso, foi possível analisar a Razão de Risco (*Hazard Ratio* - HR) de cada tratamento em relação ao CN. Considera-se que CN apresenta valor igual HR = 1,0, isto é, ele é a referência quanto ao risco de mortalidade. Assim, como esperado, o CP apresentou HR = 4,22, o que indica que a chance de mortalidade em CP é 4 vezes maior do que em CN. O tratamento CL2 apresentou HR = 1,63, seguido do CA com 1,54 e CL1 com 0,85.

**Figura 7** - Probabilidade de sobrevivência de *S. postica* após exposição aos tratamentos durante o período de desenvolvimento.



5ºI: quinto ínstar; DF: defecação; PB: pupa de olhos brancos; PR: pupa de olhos rosados; PM: pupa de olhos marrons; PP: pupa de olhos pretos; EM: emergência. CN: controle negativo; CP: controle positivo - dimetoato; CA: controle do solvente - acetona; CL1: clorantraniliprole concentração 1 (2,04 ng i.a./larva); CL2: clorantraniliprole concentração 2 (0,204 ng i.a./larva). Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ; Log-Rank - Mantel-Cox). Os sombreados cinzas indicam a duração média de cada fase do desenvolvimento até a emergência dos adultos, baseando-se no CN. Fonte: Autoria própria, 2024.

Em relação ao tempo necessário para que os indivíduos alcançassem os diferentes estágios de desenvolvimento, na Tabela 3 foram apresentados os valores de média e desvio padrão do dia do marco específico. Comparando os tratamentos com o CN, observou-se que, em todos os tratamentos, a média para alcançar o 5ºI foi de 5 dias. No que se refere ao

estágio de defecação, o tratamento CP atingiu esse estágio no período de 6,76 dias, enquanto os demais tratamentos (CN, CA, CL1 e CL2) chegaram a esse estágio no dia 7.

Em relação ao período pupal, observou-se uma diferença entre os tratamentos em PB. O tratamento CL1 foi o primeiro a atingir esse estágio, no dia 11, seguido pelos tratamentos CA, CL2 e CN, com médias de 12,0, 12,3 e 12,7 dias, respectivamente. O tratamento CP, por sua vez, atingiu essa etapa após 16 dias, indicando um atraso no desenvolvimento.

Para atingir o estágio de PR, os resultados de tempo demonstram que CN atingiu esta etapa no período de 15,33 dias, igualando ao CL2. Os tratamentos CA e CL1 atingiram esse marco no dia 15. O CP foi o último tratamento a atingir essa etapa, ocorrendo somente no dia 17, mantendo o mesmo atraso visualizado para PB.

No estágio de PM, o CN foi o tratamento que primeiro atingiu esse estágio de desenvolvimento, ocorrendo em 16,33 dias. Nesse estágio, pode-se observar que os tratamentos CA, CL1 e CL2 alcançaram esse marco em 20 dias, enquanto CP chegou em 19,33 dias. Assim, pode-se observar que os tratamentos CA, CL1 e CL2 apresentaram um atraso no desenvolvimento, chegando próximo ao CP.

Em PP, CN atingiu essa última etapa de pupação, em média, no dia 20. O CA, CL1 e CL2 atingiram este estágio, em média, no dia 21 e o CP alcançou esse estágio apenas no dia 23.

Por fim, em EM, as abelhas do CN apresentaram média de emergência em 26,33 dias. No CP, as abelhas emergiram no dia 28, enquanto nos demais tratamentos (CA, CL1 e CL2) as abelhas emergiram no dia 29, finalizando as análises de desenvolvimento.

É importante ressaltar que as taxas de emergência variaram entre os tratamentos, com CP apresentando o menor valor (Tabela 1). Portanto, a quantidade de abelhas emergidas em relação à quantidade inicial de larvas não foi a mesma entre os diferentes tratamentos.

**Tabela 3** – Eventos que ocorrem de acordo com o desenvolvimento em dias de *S. postica* após exposição aos tratamentos.

| Trat. | Estágios de desenvolvimento |                |                 |                 |                 |                 |                 |
|-------|-----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|       | 5 <sup>o</sup> I            | DF             | PB              | PR              | PM              | PP              | EM              |
| CP    | 5.00 ±<br>0.00              | 6.76 ±<br>0.58 | 16.00 ±<br>0.00 | 17.00 ±<br>0.00 | 19.33 ±<br>1.15 | 23.00 ±<br>0.00 | 28.00 ±<br>0.00 |
| CN    | 5.00 ±<br>0.00              | 7.00 ±<br>0.00 | 12.67 ±<br>0.58 | 15.33 ±<br>0.58 | 16.33 ±<br>1.15 | 20.00 ±<br>1.73 | 26.33 ±<br>0.58 |
| CA    | 5.00 ±<br>0.00              | 7.00 ±<br>0.00 | 12.00 ±<br>0.00 | 15.00 ±<br>0.00 | 20.00 ±<br>0.00 | 21.00 ±<br>0.00 | 29.00 ±<br>0.00 |
| CL1   | 5.00 ±<br>0.00              | 7.00 ±<br>0.00 | 11.00 ±<br>0.00 | 15.00 ±<br>0.00 | 20.00 ±<br>0.00 | 21.00 ±<br>0.00 | 29.00 ±<br>0.00 |
| CL2   | 5.00 ±<br>0.00              | 7.00 ±<br>0.00 | 12.33 ±<br>0.58 | 15.33 ±<br>0.58 | 20.00 ±<br>0.00 | 21.00 ±<br>0.00 | 29.00 ±<br>0.00 |

Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. 5<sup>o</sup>I: quinto ínstar; DF: defecação; PB: pupa de olhos brancos; PR: pupa de olhos rosados; PM: pupa de olhos castanhos; PP: pupa de olhos pretos; EM: emergência. Trat.: tratamentos; CN: controle negativo; CP: controle positivo - dimetoato; CA: controle solvente - acetona; CL1: clorraniliprole dose 1 (2,04 ng i.a./larva); CL2: clorraniliprole dose 2 (0,204 ng i.a./larva).

### 4.3 Morfometria

Em relação aos resultados morfométricos, foi observado um efeito refletido tanto na largura da cabeça (MC) quanto na distância intertegular (MI) (Tabela 4). Para a MC, verificou-se uma diferença significativa no tratamento CL1 em comparação com os tratamentos (CN, CA e CL2). Da mesma forma, o tratamento CL2 apresentou diferença significativa de MI em relação aos outros (CN, CA e CL1). Esses resultados indicam a influência do clorraniliprole no desenvolvimento de estruturas importantes para o sucesso do forrageamento, pois CL1 induziu aumento na medida da cabeça, enquanto CL2 induziu aumento na distância intertegular.

**Tabela 4** - Resultados das medições da largura da cabeça e da distância intertegular de abelhas *S. postica* adultas, após exposição aos tratamentos.

| Parâmetros | CN            | CA            | CL1                  | CL2                  |
|------------|---------------|---------------|----------------------|----------------------|
| MC         | 0,43 ± 0,02 a | 0,44 ± 0,02 a | <b>0,45 ± 0,01 b</b> | 0,44 ± 0,02 a        |
| MI         | 0,29 ± 0,01 a | 0,29 ± 0,03 a | 0,29 ± 0,01 a        | <b>0,30 ± 0,02 b</b> |

Resultados apresentados como média e desvio padrão. MC: Medição da largura da cabeça; MI: Medição da distância intertegular; CN: controle negativo; CA: controle do solvente; CL1: Clorantraniliprole concentração 1 (2,04 ng i.a./larva); CL2: Clorantraniliprole concentração 2 (0,204 ng i.a./larva). Letras diferentes indicam diferença significativa significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ; Kruskal-Wallis/Dunn para MC e MI). Fonte: Autoria própria, 2024.

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados revelam que a exposição oral a doses subletais do clorantraniliprole durante os estágios iniciais de desenvolvimento de *S. postica* não afetou a mortalidade, a pupação ou a emergência. No entanto, causou efeitos tardios em estágios específicos de desenvolvimento e alterou a morfometria externa de indivíduos recém-emergidos.

Um estudo que corrobora nossos resultados foi realizado por He *et al.* (2024), ao avaliarem os efeitos do clorantraniliprole de alta pureza em larvas de rainhas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) (HE *et al.*, 2024). As concentrações 0,2 ng i.a./larva, aproximadamente equivalente à CL2, e 1,0 ng/larva, não causaram mortalidade, assemelhando-se ao controle. Entretanto, concentrações mais elevadas, como 10,0 ng/larva e 20,0 ng/larva, exibiram maior mortalidade (HE *et al.*, 2024). Além disso, as taxas de emergência das rainhas expostas a 0,2 ng/larva e 1,0 ng/larva não diferiram significativamente do controle, corroborando com os resultados do presente estudo (HE *et al.*, 2024). No entanto, os mesmos autores observaram diferenças significativas entre o tratamento controle e as concentrações de 2,0, 10,0 e 20,0 ng/larva (HE *et al.*, 2024), sendo a dose de 2,0 ng/larva semelhante a CL1 deste estudo. Os resultados indicam que, embora CL1 e CL2 não tenham causado alterações significativas, concentrações mais altas, comuns em áreas agrícolas, podem levar ao acúmulo progressivo de toxinas, potencializando seus efeitos nas abelhas (CHAM *et al.*, 2019).

Outro estudo reforça esses efeitos subletais, demonstrando que produtos à base de clorantraniliprole, tanto de grau técnico quanto formulados, são indutores de baixa toxicidade para abelhas em termos de mortalidade (WILLIAMS; SWALE; ANDERSON, 2020). Dinter *et al.* (2009) também destacaram esse perfil ao verificarem, em teste de exposição oral e por

contato, baixa toxicidade intrínseca do composto. Os autores também relataram que o NOEC (*No Observed Effect Concentration*), ou seja, a concentração na qual não foi detectado efeito adverso para a exposição oral, foi de 63 µg (equivalente a 63.000 ng) (DINTER *et al.*, 2009), um valor expressivamente superior ao empregado na maioria dos estudos. Contudo, embora o clorantraniliprole não tenha causado danos evidentes nas taxas de mortalidade, pupação e emergência, apresentou efeitos sobre o desenvolvimento das abelhas.

A análise dos estágios de desenvolvimento de *S. postica* (5<sup>o</sup>I, DF, PB, PR, PM, PP e EM) revelou que a progressão seguiu o padrão descrito por Rosa-Fontana *et al.* (2020). No entanto, foi observado uma mortalidade entre estágios específicos do desenvolvimento em CL2, especificamente entre a transição de DF para PB e de PR para PM. Essa resposta tardia à toxicidade, observada principalmente nos estágios pupais sob CL2, pode estar associada à permanência dessas toxinas no corpo gorduroso das abelhas. Esse tecido desempenha um papel fundamental, como a produção de proteínas e o armazenamento e metabolismo de desintoxicação (FENG *et al.*, 2018). A degradação dessas substâncias ocorre por meio de enzimas, como as glutatona transferases (GSTs), carboxilesterases (CbEs) e, principalmente, as monooxigenases do citocromo P450, amplamente reconhecida pela atuação na biotransformação de xenobióticos em insetos (GONG; DIAO, 2017). Durante a metamorfose, o corpo gorduroso mobiliza suas reservas energéticas e proteicas para atender às demandas metabólicas das pupas, o que pode ocasionar a liberação do inseticida previamente armazenado na hemolinfa, intensificando seus efeitos tóxicos (TADEI *et al.*, 2019).

Outro fator que pode contribuir para os efeitos observados é a dinâmica das proteínas de armazenamento, como as hexamerinas, por exemplo. Estas proteínas desempenham papel essencial como reserva de aminoácidos durante o estágio de não alimentação do ciclo de vida dos insetos holometábolos (HUNT; BUCK; WHEELER, 2003; CUNHA *et al.*, 2005). Elas acumulam-se em grandes quantidades nas larvas tardias de quinto ínstar, atingindo seu pico no estágio de pré-pupa/pupa-inicial, e diminuem progressivamente até serem quase totalmente consumidas pelos adultos recém-emergidos (HUNT; BUCK; WHEELER, 2003). Assim, a mortalidade significativa observada em CL2, nas transições de PB para PR e de PR para PM pode estar relacionada às modulações de hexamerinas ou de outras proteínas essenciais, comprometendo processos vitais para o desenvolvimento adequado das pupas (HUNT; BUCK; WHEELER, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que a exposição a xenobióticos pode alterar significativamente a expressão de genes relacionados às hexamerinas. Por exemplo, análises transcriptômicas revelaram que o mosquito *Aedes aegypti* apresentou níveis mais elevados de

transcrição em genes de hexamerina após exposição a xenobióticos (DAVID *et al.*, 2014). Por outro lado, foram encontrados efeitos negativos em hexamerinas de larvas de *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) (CHOWDARY *et al.*, 2024) expostas ao inseticida lambda-cialotrina (WANG *et al.*, 2019). Mesmo que o presente estudo não tenha avaliado diretamente os níveis de hexamerinas, esses resultados evidenciam que a resposta na expressão das hexamerinas pode sofrer modulações dependendo da espécie e do tipo de xenobiótico envolvido.

Foi observado um efeito paradoxal nas duas concentrações de clorantraniliprole, em que a segunda dose (CL2), contendo a menor concentração do ingrediente ativo, afetou o desenvolvimento e a sobrevivência das abelhas, enquanto a primeira dose (CL1), com maior concentração, não causou impacto significativo. Esse resultado contrasta com a expectativa de que doses mais altas seriam mais tóxicas para os indivíduos, como evidenciado por He *et al.* (2024). Porém, Prado *et al.* (2019) demonstraram que a exposição de abelhas *A. mellifera* a baixas concentrações de misturas de agrotóxicos resultou em uma vida mais longa, mas com desempenho reduzido, tornando-as mais lentas e menos eficientes. Esses achados sugerem que a exposição a concentrações baixas de agrotóxicos, mesmo sem intenção de causar mortalidade, pode ter efeitos indesejáveis sobre organismos não alvo, prejudicando seu desempenho e sobrevivência.

Ainda, Witwicka *et al.* (2025) demonstraram que a exposição aguda de *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae) (DINTER *et al.*, 2009) aos inseticidas neonicotinoides e sulfoxamina desencadeou uma resposta expressiva nos genes envolvidos na desintoxicação. No referido estudo, 91% dos 61 genes avaliados foram superexpressados, destacando-se a família do citocromo P450, amplamente reconhecida por seu papel na metabolização de compostos xenobióticos. No presente trabalho, a menor concentração de clorantraniliprole (CL2) pode não ter sido suficiente para induzir adequadamente a expressão desses genes de desintoxicação. De acordo com He *et al.* (2024), abelhas rainhas de *A. mellifera*, expostas ao clorantraniliprole durante a fase larval, apresentaram o maior nível de expressão de CYP450 na dose de 1 ng/larva, indicando uma resposta dependente da concentração. Assim, é possível que a dose mais elevada utilizada neste estudo (CL1) tenha induzido eficientemente a ativação dos mecanismos detoxificantes, resultando em menor impacto fisiológico nas abelhas da espécie *S. postica*.

A toxicidade associada ao tratamento com acetona (CA) foi observada em *S. postica*, como evidenciado pelas diferenças na mortalidade e sobrevivência dos indivíduos ao longo do desenvolvimento até a emergência. A acetona é o solvente mais comumente usado em

estudos com abelhas (DINTER *et al.*, 2009; HE *et al.*, 2024), e seu uso é permitido pelas diretrizes da OECD TG 237 (2013), em concentrações de até 5% na dieta larval artificial de *A. mellifera*. No entanto, alguns estudos demonstraram que a acetona pode exercer efeitos tóxicos dependendo da concentração usada. Schmehl *et al.* (2018) relataram toxicidade quando aplicada a 2,0% na dieta, enquanto Tomé *et al.* (2023), em um teste larval crônico, observaram impactos negativos na emergência individual mesmo em concentrações tão baixas quanto 0,5%. Essas descobertas ressaltam que a sensibilidade das abelhas pode variar entre os estudos, destacando a necessidade de considerar respostas específicas, da espécie ou do estágio, aos solventes usados em bioensaios, bem como a seleção cuidadosa do tipo de solvente empregado (TOMÉ *et al.*, 2023).

Em relação ao tempo necessário para os indivíduos alcançarem os diferentes estágios de desenvolvimento, nossos resultados foram comparados com os de Rosa-Fontana *et al.* (2020), que utilizaram a exposição das larvas *S. postica* ao alimento puro e adotaram os mesmos métodos de controle de umidade empregados no presente estudo. No estudo de Rosa-Fontana *et al.* (2020), as larvas atingiram o 5ºI larval em 5,3 dias, semelhante ao presente estudo, no qual foi observado em todos os tratamentos (CP, CN, CA, CL1 e CL2) no dia 5. No estágio de defecação, Rosa-Fontana *et al.* (2020) observaram esse estágio no dia 7, valor equivalente ao encontrado nos resultados para a maioria dos tratamentos, exceto para CP, que apresentou esse estágio em 6,7 dias.

Em relação às pupas, Rosa-Fontana *et al.* (2020) registraram o estágio de pupa de olho branco (PB) em 14,5 dias. No presente estudo, os períodos observados para esse estágio foram 11,00, 12,00, 12,33, 12,67 e 16,00 dias, para os tratamentos CL1, CA, CL2, CN e CP, respectivamente. Esses resultados demonstram um adiamento no desenvolvimento para esse estágio em quase todos os tratamentos, com exceção do CP, que apresentou PB apenas no dia 16,00. No entanto, para o estágio de pupa de olho rosa (PR), as médias se tornaram mais próximas. Rosa-Fontana *et al.* (2020) relataram uma média de 16,5 dias, enquanto neste estudo os tratamentos CA, CL1, CL2 e CN apresentaram médias de 15,00, 15,00, 15,33 e 15,33 dias, respectivamente. Já o tratamento CP atingiu esse estágio no dia 17,00.

Em relação ao estágio pupa de olho marrom (PM), Rosa-Fontana *et al.* (2020) observaram uma média de 19,17 dias, valor semelhante ao obtido no presente estudo, no qual os tratamentos CP, CA, CL1 e CL2 apresentaram média de 19,33, 20,00, 20,00 e 20,00 dias, respectivamente. No entanto, o CN atingiu esse estágio mais precocemente em 16,33 dias. Em relação a pupa de olho preto (PP), Rosa-Fontana *et al.* (2020) registraram uma média de

21 dias, resultado que corrobora com o obtido neste estudo. Nesse estágio, o CN foi o primeiro a atingi-lo, no dia 20,00, seguido do CA, CL1 e CL2, no dia 21, e CP no dia 23.

Por fim, no estágio de emergência, Rosa-Fontana *et al.* (2020) relataram uma média de 31,1 dias. Nesse estudo, verificou-se uma antecipação desse evento para todos os tratamentos, sendo CN o mais precoce, com emergência em 26,33 dias, seguido de CP no dia 28,00, e CA, CL1 e CL2 no dia 29. É importante destacar que fatores ambientais, como umidade e temperatura, podem influenciar a duração dos estágios de desenvolvimento, ou seja, o intervalo entre as mudas (MENEZES, VOLLET-NETO; FONSECA, 2013). Como a B.O.D utilizada neste estudo não possuía controle de umidade, apenas de temperatura, essa variável pode ter impactado o desenvolvimento dos indivíduos, especialmente ao ser analisada ao longo dos dias.

Em relação aos resultados morfométricos, foi observado um impacto refletido tanto na largura da cabeça (MC) quanto na distância intertegular (MI). Rain, Nongthomba e Ground (2014) demonstraram que, durante o desenvolvimento do músculo de voo em *Drosophila sp.*, ocorre inicialmente um crescimento hiperplásico, caracterizado pelo aumento no número de células musculares, seguindo de um crescimento hipertrófico, relacionado ao aumento do tamanho das fibras já formadas. Nesse processo, os mioblastos (células precursoras do músculo) se fundem às estruturas larvais preexistentes, promovendo a formação de novas miofibrilas e aumentando o volume muscular. Assim, durante a exposição das larvas ao clorantraniliprole, pode ter ocorrido um aumento na quantidade de mioblastos, favorecendo o crescimento muscular e resultando nas alterações morfométricas observadas (RAIN; NONGTHOMBA; GROUND, 2014).

A região cerebral das abelhas é altamente plástica, ou seja, pode se modificar ao longo do desenvolvimento. Esse processo ocorre tanto no início do desenvolvimento (JONES *et al.*, 2013), como no início da fase adulta (FARRIS; ROBINSON; FAHRBACH, 2001). Segundo Jones *et al.* (2013), o volume cerebral em abelhas pode aumentar com a experiência da tarefa realizada na colônia, ou também o ambiente vivenciado durante o desenvolvimento pode afetar consideravelmente o cérebro, com possíveis implicações para o processamento sensorial, aprendizagem e memória.

Em neurônios dorsais medianos não pareados da barata *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) (ZENG *et al.*, 2019), a ativação dos receptores de rianodina foi associada a um aumento na liberação de cálcio intracelular (MESSUTAT; HEINE; WICHER, 2001). Considerando que o clorantraniliprole atua diretamente sobre esses receptores, promovendo sua abertura prolongada, uma hipótese para o aumento da largura da cabeça

seria o acúmulo excessivo de cálcio no citoplasma. Esse desequilíbrio iônico pode ativar vias de sinalização envolvidas na neurogênese. Nesse contexto, o aumento observado na largura da cabeça dos indivíduos expostos ao inseticida pode estar relacionado a um acréscimo no número ou no volume de neurônios, como consequência indireta da desregulação dos níveis de cálcio intracelular induzida pelo composto.

Embora este estudo não tenha avaliado diretamente a longevidade das abelhas emergentes, outros estudos sugerem que alterações morfológicas podem comprometer o desempenho das abelhas adultas, particularmente em relação à sua capacidade de forrageamento (BARBOSA *et al.*, 2015). Tais prejuízos afetam diretamente a dinâmica e a estabilidade da colônia, tornando-a mais vulnerável a fatores ambientais e aumentando sua suscetibilidade a doenças (DECOURTYE; DEVILLERS, 2010). Assim, avaliar os efeitos da exposição a concentrações subletais de agrotóxicos no desenvolvimento das abelhas é essencial para compreender de que forma esses compostos impactam sua sobrevivência e saúde a longo prazo (DORNELES *et al.*, 2021).

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o clorotraniliprole, nas duas concentrações testadas (CL1 e CL2), não induziu mortalidade larval e inibição da taxa de pupação e emergência nas abelhas sem ferrão da espécie *S. postica*. No entanto, a segunda dose (CL2) resultou em diferença no desenvolvimento larval e pupal confirmada pela curva de sobrevivência. Além de diferenças significativas na morfometria externas das abelhas expostas ao clorotraniliprole.

Conclui-se que, embora o clorotraniliprole não apresente toxicidade em relação a mortalidade, pupação e emergência das abelhas, ele pode impactar negativamente a prole de uma colônia exposta ao longo do desenvolvimento.

Diante disso, ressalta-se a importância de estudos ecotoxicológicos que avaliem os efeitos dos agrotóxicos em diferentes estágios do desenvolvimento das abelhas sem ferrão, desde a fase larval até a emergência dos adultos. Além disso, este estudo dá oportunidades para futuras pesquisas envolvendo tanto o ingrediente ativo clorotraniliprole quanto o desenvolvimento das abelhas sem ferrão. A continuidade dos estudos será crucial para aprofundar o entendimento sobre os efeitos desse agrotóxico em diferentes espécies de abelhas sem ferrão, contribuindo para a preservação desses polinizadores essenciais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. D. *et al.* Bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*): uma revisão sobre o inseto e perspectivas para o manejo da praga. Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2020. (Documentos, 372).  
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1128859/1/documentos-372-fina.pdf>
- ARENA, M., SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, v. 23, p. 324–334, 2014.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-014-1190-1>
- BARBOSA, W. F. *et al.* Biopesticide-induced behavioral and morphological alterations in the stingless bee *Melipona quadrifasciata*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.34, ed. 9, p. 2149-2158, 2015. <https://doi.org/10.1002/etc.3053>
- BARBOSA, D. B. *et al.* As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, n.4, p. 694-704, 2017.  
<https://doi.org/10.21674/2448-0479.34.694-703>.
- BOTINA, L. L. *et al.* Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). **MethodsX**, v. 7, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100906>.
- BPBES. Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. São Carlos, SP: **Editora Cubo**, 1 ed., p. 1-93, 2019.  
<http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>.
- CAMPANA, L.; SOUZA, L. D. R.; HARTFELDER, K. A genética da organização social das abelhas. **Genética na Escola**, v. 18, n. 2, 2023.  
<https://doi.org/10.55838/1980-3540.ge.2023.511>
- CARVALHO, S. M. *et al.* toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (hymenoptera: apidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 4, p. 597-606, 2009.  
<https://doi.org/10.1590/1808-1657v76p5972009>
- CHAN, D. S. W. *et al.* Assessment of risk to hoary squash bees (*Peponapis pruinosa*) and other ground-nesting bees from systemic insecticides in agricultural soil. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1870, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47805-1>
- CÓRDOVA, D. *et al.* Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 1, p. 196–214, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.07.005>.
- CHOWDARY, L. R., *et al.* Off-season survival and life history of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hubner) on various host plants. **Scientific Reports**, v. 14, n. 13721, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-64639-8>
- CRUZ-LANDIM, C. Abelhas: morfologia e função de sistemas. São Paulo: Editora UNESP, 2009. ISBN 978-85-393-0430-1.

CUNHA, A. D. *et al.* Molecular cloning and expression of a hexamerin cDNA from the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 51, ed. 10, p. 1135-1147, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.06.004>.

DAVID, J. P. *et al.* Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. **BMC Genomics**, v. 15, n°. 174, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-174>

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J. Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. In: Thany, S.H. Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 683, 2010. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_8)

DINTER, A. *et al.* Chlorantraniliprole (Rynaxypyr): A novel DuPont™ insecticide with low toxicity and low risk for honey bees (*Apis mellifera*) and bumble bees (*Bombus terrestris*) providing excellent tools for uses in integrated pest management. **Hazards of pesticides to bees – 10th International Symposium of the ICP-Bee Protection Group**, v. 423, p. 84–96, 2009. <https://ojs.openagrar.de/index.php/JKA/article/view/137>

DORIGO, A. S. *et al.* *In vitro* larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLoS One**, v. 14, n. 9, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213109>.

DORNELES, A. L., *et al.* Larvae of stingless bee *Scaptotrigona bipunctata* exposed to organophosphorus pesticide develop into lighter, smaller and deformed adult workers. **Environmental Pollution**, 2021. [10.1016/j.envpol.2020.116414](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116414)

DOS SANTOS, Y. B. *et al.* Inseticidas de diamida e seus efeitos sobre mamíferos diamide insecticides and their effects on mammals. In: NETO, O.B. *et al.* (Orgs). **Ciências Biológicas e da Saúde: integrando saberes em diferentes contextos**, 2024, v. 7, ed. 1. p. 148 - 159, São Carlos: Editora Científica Digital.

ENGELS, W., ROSENKRANZ, P., & ENGELS, E. Thermoregulation in the nest of the neotropical stingless bee *Scaptotrigona postica* and a hypothesis on the evolution of temperature homeostasis in highly eusocial bees. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 30, ed. 4, p. 193–205, 1995. <https://doi.org/10.1080/01650529509360958>

FARRIS, S. M.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, ed. 16, p. 6395-404, 2001. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-16-06395.2001>

FENG, Y. *et al.* Mid-Infrared Spectroscopy Study of Effects of Neonicotinoids on Forager Honey Bee (*Apis mellifera*) Fat Bodies and Their Connection to Colony Collapse Disorder. **BioRxiv**, 2018. <https://doi.org/10.1101/205112>.

FERNANDEZ, F. C.; CRUZ-LANDIM, C.; MALASPINA, O. Influence of the insecticide pyriproxyfen on the flight muscle differentiation of *Apis Mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 844-848, 2012. <https://doi.org/10.1002/jemt.22003>

FISCHER, I.; MILTON, C.; WALLACE, H. Toxicity testing is evolving!. **Toxicology Research**, v. 9, n. 2, p. 67–80, 2020. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa011>

FMC. [Bula]. Grânulos Dispersíveis em Água (WG) . Campinas, FMC Química do Brasil Ltda., 29 de março de 2021.  
<https://fmcagricola.com.br/Content/Fotos/Bula%20-%20Altacor.pdf>.

GOMES, I. N. *et al.* Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology**, v. 29, p. 97–107, 2020.  
<https://doi.org/10.1007/s10646-019-02145-8>

GOMES, I. N. *et al.* The survival and flight capacity of commercial honeybees and endangered stingless bees are impaired by common agrochemicals. **Ecotoxicology**, v. 32, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02699-8>

GONG, Y., DIAO, Q. Current knowledge of detoxification mechanisms of xenobiotic in honey bees. **Ecotoxicology**, v. 26, p. 1–12, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1742-7>

HAAS, J. *et al.* A mechanism-based approach unveils metabolic routes potentially mediating chlorantraniliprole synergism in honey bees, *Apis mellifera* L., by azole fungicides. **Pest Management Science**, v. 78, 2021. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.6706>

HE, Q. *et al.* Does the use of chlorantraniliprole during queen development adversely impact health and viability?. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 202, 2024.  
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2024.105920>

HIPÓLITO, J.; BOSCOLO, D.; VIANA, B. F. Landscape and crop management strategies to conserve pollination services and increase yields in tropical coffee farms. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 256, p. 218-225, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.09.038>

HUNT, J. H.; BUCK, N. A.; WHEELER, D. E. Storage proteins in vespidae wasps: characterization, developmental pattern, and occurrence in adults. **Journal of Insect Physiology**, v. 49, ed. 8, p. 785-794, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00115-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00115-X).

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. Bees, ecosystem services and the Brazilian Forest Code. **Biota Neotrópica**, v. 10, n. 4, 2010.  
<https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000400008>

JINWL, R. U. Sex-, stage- and tissue-specific regulation by a mosquito hexamerin promoter. **Insect Molecular Biology**, v. 15, ed. 3 p. 301-311, 2006.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00644.x>

JONES B. M., *et al.* Plasticity of the worker bumblebee brain in relation to age and rearing environment. **Brain Behav. Evol**, v. 82, p. 250-261, 2013. doi:10.1159/000355845

KADALA, A. *et al.* Honey bees long-lasting locomotor deficits after exposure to the diamide chlorantraniliprole are accompanied by brain and muscular calcium channels alterations. **Scientific Reports**, v. 9, n. 2153, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39193-3>

KADALA, A.; CHARRETON, M.; COLLET, C. Flubendiamide, the first phthalic acid diamide insecticide, impairs neuronal calcium signalling in the honey bee's antennae. **Journal of Insect Physiology**, v. 125, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104086>.

- MESSUTAT, S.; HEINE, M.; WICHER, D. Calcium-induced calcium release in neurosecretory insect neurons: fast and slow responses. **Cell Calcium**, v. 30, ed. 3, p. 199-211, 2001. 10.1054/ceca.2001.0227
- MUNDY-HEISZ, K. A.; PROSSER, R. S.; RAINE, N. E. Acute oral toxicity and risks of four classes of systemic insecticide to the Common Eastern Bumblebee (*Bombus impatiens*), **Chemosphere**, v. 295, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133771>.
- LOURENCETTI, A. P. S. *et al.* Surrogate species in pesticide risk assessments: Toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120842>.
- MANTHEY, C. *et al.* Complete metamorphosis and microbiota turnover in insects. **Molecular Ecology**, v. 32, p. 6543–6551, 2022. <https://doi.org/10.1111/mec.16673>
- MARTINS, J. R.; BITONDI, M. M. G. Nuclear Immunolocalization of Hexamerins in the Fat Body of Metamorphosing Honey Bees. **Insects**, v. 3, ed. 4, p. 1039-1055, 2012. <https://doi.org/10.3390/insects3041039>
- MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; FONSECA, V. L. I. An advance in the in vitro rearing of stingless bee queens. **Apidologie**, v. 44, p. 491–500, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0197-6>
- MENEZES, C. *et al.* Abelhas sem ferrão relevantes para a meliponicultura no Brasil [livro eletrônico]. **Associação Brasileira de Estudos das Abelhas (A.B.E.L.H.A)**, ed. 1, p. 1-98, 2023.
- NOGUEIRA, D. S. Overview of Stingless Bess in Brazil (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **EntomoBrasilis**, v. 16, 2023. <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v16.e1041>
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development. **Test nº 237**: Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure. (Diretrizes da OCDE para o Teste de Produtos Químicos, Seção 2). 2013. <https://doi.org/10.1787/9789264203723-en>
- PRADO, A. *et al.* Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees. **Science of The Total Environment**, v. 650, p. 1250 - 1260, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.102>
- RAI, M.; NONGTHOMBA, U.; GROUNDS, M. D. Chapter Nine - Skeletal Muscle Degeneration and Regeneration in Mice and Flies. **Current Topics in Developmental**, v. 108, p. 247-281, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391498-9.00007-3>
- ROSA-FONTANA, A. *et al.* **Placas de acrílico para criação *in vitro* de abelhas sem ferrão**. Número de registro: BR1020220011354, Instituição de registro: Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/01/2022.
- 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, p. 114849, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114849>

SATTELLE, D. B., CORDOVA, D., CHEEK, T.R. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invert Neurosci**, v. 8 , n°. 107, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10158-008-0076-4>

SCHMEHL, D.R. *et al.* Novel approaches for integrating a compound with poor solubility into honey bee diets for laboratory testing. Proceedings of the 2018 American Bee Research Conference. **Bee World**, v. 95, n. 2, p. 47-52, 2018. 10.1080/0005772X.2018.1450208.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R., ALMEIDA, E. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. ed. 1, p. 253, Belo Horizonte 2002. [https://hbjunior19.wordpress.com/wp-content/uploads/2012/06/silveira\\_melo\\_almeida\\_2002\\_abelhas\\_brasileiras.pdf](https://hbjunior19.wordpress.com/wp-content/uploads/2012/06/silveira_melo_almeida_2002_abelhas_brasileiras.pdf).

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Sci Rep** v. 9, n. 3277, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>

TOMÉ, H. V. V. *et al.* Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. **Environmental Pollution**, v. 256, n. 113420, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.11342>

TOMÉ, H. V. V. *et al.* Chronic larval and adult honey bee laboratory testing: Which dietary additive should be considered when a test substance is not solubilized in acetone?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 268, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115718>

US-EPA - United States Environmental Protection Agency. **Models for Pesticide Risk Assessment. 2015**. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/models-pesticide-risk-assessment>

VINEETHA, V.; CHELLAPPAN, M.; PATHROSE, B. A rapid and easy bioassay method for stingless bees *Tetragonula travancorica* shanas and faseeh. **Indian Journal of Entomology**, v. 85, n. 4, p. 1-4. 2022. <https://doi.org/10.55446/IJE.2022.582>

VOLLET-NETO, A.; MENEZES, C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Behavioural and developmental responses of a stingless bee (*Scaptotrigona depilis*) to nest overheating. **Apidologie**, v. 46, p. 455–464, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0338-6>

WANG, S. *et al.* Cloning and characterization of hexamerin in *Spodoptera exigua* and the expression response to insecticide exposure. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 22, ed. 2, p. 602 - 610, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2019.04.006>

WEN, X. *et al.* Pesticide residues in the pollen and nectar of oilseed rape (*Brassica napus* L.) and their potential risks to honey bees. **Science of The Total Environment**, v. 786, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147443>

WILLIAMS, J. R.; SWALE, D. R.; ANDERSON, T. D. Comparative effects of technical-grade and formulated chlorantraniliprole to the survivorship and locomotor activity of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **Pest Management Science**, v. 76, p. 2582–2588, 2020. <https://doi.org/10.1002/ps.5832>

WITWICKA, A. *et al.* Acute and chronic pesticide exposure trigger fundamentally different molecular responses in bumble bee brains. **BMC Biology**, v. 23, n°. 72, 2025.  
<https://doi.org/10.1186/s12915-025-02169-z>

ZENG, C. *et al.* The Role of *Periplaneta americana* (Blattodea: Blattidae) in Modern Versus Traditional Chinese Medicine. **Journal of Medical Entomology**, v. 56, ed. 6, p. 1522-1526, 2019. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz081>

## CAPÍTULO 2

### **Efeitos da exposição subletal ao clorantraniliprole na formação da musculatura de voo de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) por meio de análises histológicas**

#### **RESUMO**

O forrageamento das abelhas é essencial para a polinização e está diretamente relacionado a integridade da musculatura de voo, cuja formação ocorre durante a pupação. No entanto, populações de abelhas sem ferrão estão em declínio, principalmente pelo uso intensivo de agrotóxicos. Dentre eles, o clorantraniliprole, uma diamida, age nos receptores de rianodina, alterando a homeostase e comprometendo a contração muscular. Assim, este estudo objetivou avaliar se abelhas da espécie *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), expostas ao ingrediente ativo clorantraniliprole durante a fase larval, apresentam alterações na formação da musculatura de voo em abelhas adultas emergentes. Para isso, larvas foram expostas aos seguintes tratamentos: controle negativo (CN) (apenas alimento), controle do solvente (CA) (acetona - 0,2%), além de duas concentrações subletais de clorantraniliprole (CL1 - 2,04 ng i.a./larva e CL2 - 0,204 ng i.a./larva). Após a emergência, as abelhas foram dissecadas, o tecido muscular foi fixado e posteriormente incluído em resina para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). Durante as análises, foram observadas estruturas circulares na matriz extracelular do tecido muscular, ao redor das fibras musculares, podendo indicar a presença de hemócitos. A fim de anular outras hipóteses, foram realizadas inclusões complementares em parafina, posteriormente submetidas às colorações de Azul de Metileno (AM), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Tricrômico de Mallory (MY) e Tricrômico de Masson (MN). Além disso, foi realizada a medição da área nuclear. As análises histológicas revelaram fibras musculares organizadas em CN e CA, porém, com aumento de tamanho nuclear em CA. Já nos tratamentos com clorantraniliprole (CL1 e CL2), observou-se desorganização das fibras, vacuolização e alterações nucleares, sugerindo efeitos subletais no tecido muscular. A coloração de PAS revelou a presença de polissacarídeos em todos os tratamentos, com maior intensidade nos expostos ao clorantraniliprole. No entanto, as colorações de tricrômico de Mallory e de Masson não se mostraram efetivas na caracterização das estruturas circulares. Conclui-se que o clorantraniliprole comprometeu a formação adequada da musculatura de voo de *S. postica*, ressaltando a importância de avaliar os impactos de agrotóxicos em polinizadores não alvo.

**Palavras-chave:** Abelha sem ferrão, forrageamento, músculo de voo, histologia, hemócitos.

## ABSTRACT

Bee foraging is essential for pollination and is directly linked to the integrity of the flight musculature, whose formation occurs during pupation. However, stingless bee populations are in decline, mainly due to the intensive use of pesticides. Among these, chlorantraniliprole, a diamide, acts on ryanodine receptors, altering homeostasis and impairing muscle contraction. Thus, this study aimed to evaluate whether *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) bees exposed to the active ingredient chlorantraniliprole during the larval stage exhibit alterations in the formation of flight musculature in emerged adult bees. For this purpose, larvae were exposed to the following treatments: negative control (CN) (food only), solvent control (CA) (acetone – 0.2%), and two sublethal concentrations of chlorantraniliprole (CL1 – 2.04 ng a.i./larva and CL2 – 0.204 ng a.i./larva). After emergence, the bees were dissected, and the muscle tissue was fixed and embedded in resin for staining with Hematoxylin and Eosin (HE). During analyses, circular structures were observed in the extracellular matrix of the muscle fibers, possibly indicating the presence of hemocytes. To rule out other hypotheses, complementary staining procedures were performed. Samples were embedded in paraffin and submitted to Methylene Blue (AM), Periodic Acid-Schiff (PAS), Mallory's Trichrome (MY), and Masson's Trichrome (MN) staining. Additionally, nuclear area measurements were conducted. Histological analyses revealed organized muscle fibers in CN and CA, although in CA, nuclei appeared enlarged. In the chlorantraniliprole treatments (CL1 and CL2), fiber disorganization, vacuolization, and nuclear alterations were observed, suggesting sublethal effects on muscle tissue. PAS staining revealed the presence of polysaccharides in all treatments, with greater intensity in those exposed to chlorantraniliprole. However, Mallory and Masson trichrome stainings were not effective in characterizing the circular structures. It is concluded that chlorantraniliprole compromised the proper formation of *S. postica* flight musculature, highlighting the importance of evaluating the impacts of pesticides on non-target pollinators.

**Keywords:** Stingless bee, foraging, flight muscle, histology, hemocytes.

## 1 INTRODUÇÃO

A polinização é um serviço ambiental essencial realizado pelas abelhas e depende diretamente de sua capacidade de forrageamento, garantindo o acesso a recursos como pólen e néctar, fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da colônia (NICHOLLS; HEMPEL DE IBARRA, 2017). De acordo com o Relatório Temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil (2019), das 191 espécies de plantas cultivadas e silvestres relacionadas à alimentação, para as quais há informações sobre os serviços ambientais de polinização, foi possível identificar que 91 delas apresentam algum grau de dependência dos polinizadores (BPBES, 2019), demonstrando a importância desses organismos para a produtividade agrícola.

No entanto, estudos têm demonstrado que as populações de abelhas sem ferrão estão em declínio global devido a múltiplas ameaças, como a perda de habitat, a competição por recursos, mudanças climáticas, introdução de espécies exóticas e, principalmente o uso intensivo de agrotóxicos na agricultura (TOLEDO-HERNÁNDEZ, *et al.*, 2022). Esse declínio dos polinizadores pode resultar em menor disponibilidade de alimentos e diminuição na diversidade de plantas silvestres, impactando a saúde e a segurança nutricional da população (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010; RECH *et al.*, 2014; IPBES, 2016).

Nesse contexto, uma das principais causas desse declínio está relacionada à exposição das abelhas forrageiras a vários agrotóxicos utilizados ao longo do ciclo agrícola. Ao coletarem recursos florais contaminados, elas levam resíduos para a colônia, expondo toda a população e oferecendo esses resíduos como alimento para as larvas nos discos de cria, que irão se alimentar e se desenvolver ao longo do período (TOMÉ *et al.*, 2020; WEN *et al.*, 2021).

Dentre esses agrotóxicos, o clorantraniliprole (CL), pertencente à classe das diamidas antranílicas, foi registrado para o uso em diversas culturas agrícolas (FMC, 2021). As diamidas atuam de forma seletiva nos receptores de rianodina (RyR), que são grandes canais responsáveis pela liberação de cálcio armazenado intracelularmente (LAHM *et al.*, 2007). A ativação desses canais RyR pelas diamidas promove um aumento significativo na concentração de cálcio no citoplasma, comprometendo a homeostase celular (DU; FU, 2023). No caso das abelhas, essa disfunção pode ter um impacto direto na musculatura de voo, uma vez que o cálcio interfere no processo de contração muscular, essencial para o voo (KADALA *et al.*, 2019).

A atividade de forrageamento das abelhas está diretamente relacionada à formação e a integridade da musculatura de voo. Esse músculo se desenvolve durante a pupação e ocupa grande parte do tórax no inseto adulto (ADADE; CRUZ-LANDIM, 2004). Trata-se de uma musculatura composta por fibras do tipo fibrilar, formadas por miofibrilas, mitocôndrias e núcleos, sendo interligados por ramos traqueolares responsáveis pela oxigenação do tecido muscular (FERNANDEZ-WINCKLER; CRUZ-LANDIM, 2008).

Nas abelhas, não há uma membrana envoltória em torno dos feixes musculares como ocorre nos vertebrados, assim como não há tecido conjuntivo separando uma fibra da outra, sendo mantidas juntas apenas por ramos traqueais (ADADE; CRUZ-LANDIM, 2004). No entanto, Smith (1961), cita que o tecido conjuntivo exerce um papel essencial na penetração de algumas traquéolas nos músculos de insetos. Na larva-da-farinha (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Tenebrionidae) (ROSSI-BATIZ; REVUELTA; GÓMEZ-DE-SARAVIA, 2025), por exemplo, é possível observar traquéolas que invadem profundamente a fibra muscular, acompanhadas pela membrana plasmática. Esse processo só é viável devido ao suporte e à flexibilidade estrutural conferidos pelo tecido conjuntivo, que preserva a integridade e a organização da fibra mesmo diante de tal inserção.

Ainda, o músculo das abelhas é assincrônico, ou seja, sua contração não ocorre de forma sincronizada com os impulsos nervosos, embora estes sejam fundamentais para iniciar e manter o voo (CRUZ-LANDIM, 2009). Dessa maneira, a organização da musculatura é essencial para o forrageamento das operárias, atividade crucial para a colônia (FERNANDEZ; CRUZ-LANDIM; MALASPINA, 2012).

Durante a formação desses músculos na pupação, as fibras musculares larvais permanecem intactas, enquanto mioblastos aderem à sua superfície, contribuindo para o aumento do diâmetro por meio da produção de novas miofibrilas. Esse processo é perceptível desde o estágio de pré-pupa inicial, sendo contínua de forma gradual ao longo da pupação. Além disso, ocorre a formação de algumas novas fibras musculares (CRUZ-LANDIM, 2009).

Deste modo, considerando o uso de agrotóxicos na agricultura e da importância da formação do músculo de voo para o forrageamento das operárias, estudos que avaliam a toxicidade em abelhas sem ferrão são cada vez mais necessários para evidenciar possíveis efeitos nesses organismos não-alvo (FISCHER; MILTON; WALLACE, 2020; GOMES *et al.*, 2023).

Desta forma, este estudo objetivou avaliar se abelhas da espécie *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), expostas ao ingrediente ativo clorantraniliprole durante a fase larval, apresentam alterações na formação da musculatura de voo em abelhas adultas emergentes.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento experimental e validação dos bioensaios**

A coleta do material biológico, as concentrações de clorantropilprole utilizadas e os bioensaios de exposição larval para obtenção da musculatura de voo, seguiram os mesmos procedimentos descritos no Capítulo 1, conforme detalhado na seção de Material e Métodos, itens 2.1, 2.2 e 2.3. O controle positivo (CP - dimetoato técnico) não foi incluído nas análises histológicas devido à elevada toxicidade da substância, conforme indicado pela OECD (2013) como produto químico tóxico de referência. A exposição resultou em alta mortalidade larval e gerou número insuficiente de abelhas emergentes para a realização das análises histológicas.

Para a realização das análises histológicas, foram conduzidos dois bioensaios, seguindo a diretriz da OCDE TG 237 (2013) para sua validação, realizados em novembro de 2024 e janeiro de 2025. Conforme esse protocolo, o tratamento com a substância de referência (controle positivo) deve resultar em uma mortalidade larval  $\geq 50\%$  até o 7º dia do experimento. Além disso, o controle negativo deve apresentar uma mortalidade larval cumulativa  $\leq 15\%$  entre o 4º e o 7º dia do teste, garantindo a confiabilidade dos resultados obtidos.

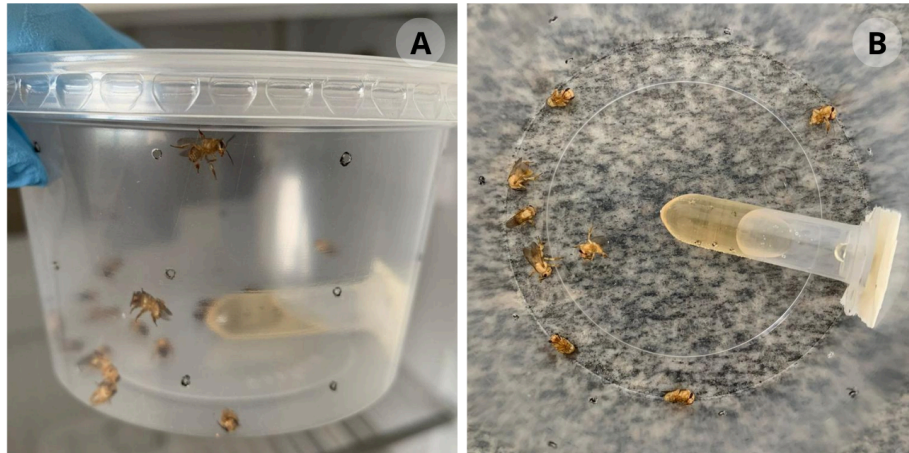
### **2.2 Maturação das abelhas emergentes**

Como o músculo de voo de abelhas *S. postica* não está completamente desenvolvido na emergência (CORREA-FERNANDEZ; CRUZ-LANDIM, 2010), após esta etapa as abelhas ainda foram acondicionadas em gaiolas, até a maturação da musculatura de voo, de modo a facilitar a dissecação.

A confecção das gaiolas seguiram as recomendações de Nocelli, Malaspina e Roat (s.d.). Desta forma, foram utilizados potes plásticos de 250 mL, com tampa, perfurados nas laterais com três furos cada, em oito fileiras, utilizando agulha pré-aquecida de 1,20x2,5 ou 1,20x40 mm (suporte rosa) para a circulação de ar (Figura 1A). No interior das gaiolas, microtubos plásticos de 2 mL foram adicionados ao fundo para que as abelhas recém-emergidas pudessem se alimentar de xarope fresco (Figura 1B). Os tubos foram perfurados três vezes na base, em duas fileiras, com agulha pré-aquecida de 0,70 x 25 e 0,70 x 30 mm (suporte preto). Foi ofertado 1,0 mL de xarope fresco por dia, preparado com açúcar cristal e água destilada pré-aquecida (1:1 m/v). As abelhas permaneceram na B.O.D. por 72

horas, a uma temperatura de 30 °C. Cada gaiola comportou as abelhas emergentes de cada réplica, comportando um número máximo de até 30 abelhas por gaiola.

**Figura 1.** Abelhas recém-emergidas mantidas em gaiolas para a maturação da musculatura de voo.



(A) Potes plásticos furados nas laterais (B) Microtubos plásticos de 2 mL adicionados ao fundo da gaiola. Fonte: Autoria própria, 2024.

### 2.3 Análise histológica com Hematoxilina e Eosina e complementares

As abelhas emergentes de cada tratamento foram anestesiadas em freezer a -20 °C por 1 minuto e, em seguida, submetidas à dissecação para a retirada da musculatura de voo. Foram dissecadas 5 abelhas de cada tratamento com o auxílio de estereomicroscópio (Leica EZ4 HD).

Após a dissecação do tórax e retirada da musculatura, o material foi fixado em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7,4 e 0,1 M, por 24 horas a 4 °C (TOPPA *et al.*, 2021). Em seguida, foi realizada a desidratação lenta em soluções crescentes de etanol por 1 hora em cada uma das concentrações (15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 85% e 90%) e 30 minutos, por três vezes, em etanol puro (100%) (SILVA-ZACARIN *et al.*, 2012).

Após a desidratação, a musculatura foi submetida à dupla coloração por hematoxilina e eosina (HE), conforme estabelecido por Junqueira e Junqueira (1983). As peças histológicas ficaram submersas em hematoxilina durante 10 minutos e, em seguida, em eosina, por mais 5 minutos. Decorrida a coloração, seguiu-se o protocolo padrão para inclusão em historesina (Leica Biosystems) para análises histológicas (SILVA-ZACARIN *et al.*, 2012). A partir dos blocos confeccionados, foram obtidos cortes com 3 µm de espessura em micrótomo (Leica RM2255) e, posteriormente, as lâminas foram secas e montadas em meio de montagem permanente (DPX - *Distrene Plasticiser Xylene*).

Para cada bloco, foram preparadas três lâminas com 15 cortes histológicos não sequenciais selecionados aleatoriamente para a análise, a fim de determinar o padrão de reação do órgão em cada tratamento e as alterações histopatológicas (lesões) a serem pontuadas.

Durante as análises das fotomicrografias coradas com HE foi possível observar alterações nas lâminas histológicas, incluindo a presença de estruturas circulares coradas em tons de rosa na matriz extracelular e entre as fibras musculares, o que poderia indicar a presença de hemócitos. Para validar essa hipótese e descartar outras possibilidades, foram aplicados métodos histológicos complementares. Para isso, as amostras de tecido muscular foram submetidas a protocolos em cortes incluídos, tanto em resina quanto em parafina.

Foram empregadas as colorações de Ácido Periódico de Schiff (PAS), contra coloração das lâminas de HE com azul de metileno (AM), Tricrômico de Mallory (MY) e Tricrômico de Masson (MN).

Os cortes, independentemente da técnica de coloração utilizada, foram analisados e fotografados em fotomicroscópio de luz Leica (Leica DM4000 B LED), utilizando-se o programa DP Controller (Leica Microsystems®) para aquisição das imagens. Foram analisadas 20 fotomicrografias de cada tratamento experimental e as alterações foram verificadas de forma qualitativa.

As lâminas histológicas foram analisadas quanto ao plano de secção das fibras musculares, sendo identificados cortes longitudinais e transversais na maioria dos tratamentos, com exceção do tratamento CL1 para a coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), para o qual foram observados apenas cortes longitudinais. A distinção entre os planos de corte foi considerada relevante para a avaliação da integridade tecidual, permitindo a detecção de possíveis danos estruturais sob diferentes perspectivas histológicas.

### **2.3.1 Coloração Ácido Periódico de Schiff**

A técnica de coloração com PAS foi utilizada para identificar polissacarídeos neutros, que são essenciais para a contração muscular, fornecendo energia para o voo. Nessa coloração, os polissacarídeos coram-se de vermelho-escuro a magenta (GARTNER; HIATT, 1943; GREGOR *et al.*, 2022).

Para a execução do protocolo, os cortes foram submersos em ácido periódico 0,4% por 10 minutos e, em seguida, lavados uma vez em água destilada. Após essa etapa, o reativo de Schiff foi adicionado e mantido em contato com os cortes por 1 hora no escuro. Finalizado

esse período, os cortes foram lavados em água corrente por 15 minutos, as lâminas foram secas e montadas em meio de montagem permanente DPX.

Durante as análises das lâminas coradas com o ácido periódico de Schiff (PAS), não foi possível observar demarcação das fibras musculares e dos núcleos, o que dificultou a identificação precisa das amostras nas lâminas. Diante dessa limitação, optou-se pela aplicação prévia da coloração com HE antes do procedimento com PAS, visando melhorar o contraste e a definição das estruturas histológicas.

Dessa maneira, as lâminas foram submetidas à coloração padrão em HE, descrita no item 2.2. Após a lavagem, foi realizado o protocolo padrão de coloração pelo método do PAS, como descrito anteriormente. Por fim, as amostras foram secas e montadas em meio de montagem permanente DPX, para posterior análise microscópica.

### **2.3.2 Hematoxilina e Eosina contra corada com Azul de metileno em resina**

Com o objetivo de diferenciar as estruturas observadas na coloração com Hematoxilina e Eosina (HE), foi realizada a contra-coloração das lâminas com Azul de Metileno (AM), um corante básico que se liga a ácidos nucleicos.

Para esse procedimento, foi seguido o mesmo protocolo de confecção dos blocos e lâminas descrito no item 2.2, no qual a musculatura foi corada com HE antes da inclusão. Após os cortes no micrótomo, as lâminas foram imersas em AM 1% por 1 minuto e, em seguida, lavadas em água corrente.

Além disso, lâminas adicionais sem coloração prévia de HE foram coradas exclusivamente com AM para comparação, seguindo o mesmo protocolo de imersão e lavagem. Em seguida, as lâminas foram secas e montadas em DPX para análise microscópica.

### **2.3.3 Protocolo em inclusão em parafina**

Para realizar as técnicas de Tricrômico de Mallory (MY) e Tricrômico de Masson (MN), as amostras foram dissecadas como descrito no item 2.2, e fixadas em formaldeído 10% por 24 horas a 4 °C. Em seguida, procedeu-se à desidratação gradual das amostras em soluções crescentes de etanol 70% e 95%, permanecendo imersas por 30 minutos em cada, seguindo por três imersões consecutivas em etanol absoluto (100%) pelo mesmo período de tempo. Posteriormente, as amostras foram submetidas a dois banhos em xilol, cada um com duração de 30 minutos. Após a desidratação, a musculatura foi infiltrada com parafina em

dois banhos de 30 minutos e, em seguida, incluída em blocos de parafina para posteriormente a realização dos cortes no micrótomo.

Para a análise, foram confeccionadas duas lâminas contendo 15 cortes histológicos não sequenciais, selecionados aleatoriamente de ambas as colorações. Os cortes foram obtidos em micrótomo (Leica RM2255) com espessura de 3  $\mu\text{m}$  e, posteriormente, submetidos ao processo de desparafinação, reidratação e colorações.

#### **2.3.4 Coloração Tricrômico de Mallory em parafina**

Para tentar identificar a natureza das estruturas observadas, foi realizada a coloração histológica pelo Tricrômico de Mallory (MY). Esse método foi utilizado para investigar se as estruturas circulares poderiam evidenciar componentes do tecido conjuntivo presente na musculatura de voo. Nessa coloração, o colágeno cora-se em azul, as fibras musculares esqueléticas e o citoplasma em vermelho, e os núcleos em preto (KIERSZENBAUM; TRES, 2016; MONTANARI, 2016; GITIRANA, 2024).

Para a realização da coloração, as lâminas foram inicialmente hidratadas em água destilada, por 3 minutos, e imersas em fucsina ácida aquosa a 0,5%, por 3 minutos. Sem lavagem intermediária, as amostras foram imediatamente transferidas para a solução composta por 0,5 g de azul de anilina, 2 g de Laranja G, 1 g de ácido fosfotúngstico e 100 mL de água destilada, onde permaneceram por 10 minutos. Concluído o processo de coloração, as lâminas foram submetidas à desidratação, diafanização e montagem com resina, para posterior análise microscópica.

#### **2.3.5 Coloração Tricrômica de Masson em parafina**

A coloração de Tricrômico de Masson (MN) também foi utilizada para investigar estruturas de colágeno na musculatura. Nessa coloração, o colágeno é corado em azul (GITIRANA, 2024), as células musculares em vermelho e os núcleos em cor escura a preta (GARTNER; HIATT, 1943; KIERSZENBAUM; TRES, 2016; MONTANARI, 2016).

Para a realização da coloração, as lâminas foram hidratadas em água destilada por 5 minutos adicionadas em solução de Bouin por 1 hora a 60 °C em estufa. Após a lavagem em água corrente, até o clareamento do resíduo amarelado da solução de Bouin, procedeu-se à coloração com hematoxilina férrica de Weigert, por 5 minutos, seguida de lavagem em água, corrente por 10 minutos. As amostras foram então coradas com escarlate de Biebrich por 2 minutos, lavadas em água destilada e diferenciadas em solução de ácido

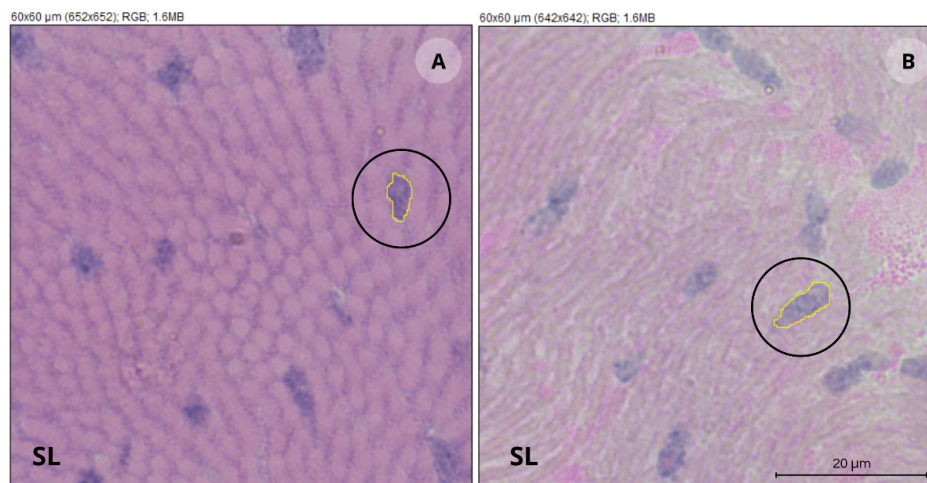
fosfotúngstico-fosfomolibdico por 5 minutos. Após nova lavagem em água destilada, as lâminas foram tratadas com solução de ácido acético glacial 1%, por 3 minutos, e lavadas novamente. Finalmente, procedeu-se à desidratação, diafanização e montagem das lâminas com resina para análise microscópica.

## 2.4 Medição dos núcleos das células musculares

Durante a análise qualitativa das lâminas histológicas com HE, foram observadas alterações no tamanho dos núcleos celulares. Para quantificar essa alteração, foi realizada a medição da área nuclear utilizando o software Fiji-ImageJ (v1.8.0, National Institutes of Health, Bethesda, EUA). As mensurações foram feitas em uma região central das fotomicrografias, equivalente a  $60 \times 60 \mu\text{m}$ , delimitando-se manualmente o contorno dos núcleos, conforme ilustrado na Figura 2.

Nas secções longitudinais, foram analisados 20 núcleos por tratamento em cortes não sequenciais das lâminas coradas com HE. Nas secções transversais, a análise não pôde ser realizada, pois no tratamento CL1 não foram localizadas secções suficientes nesse plano.

**Figura 2.** Análise da área nuclear das fibras musculares de *S. postica* expostas aos diferentes tratamentos com clorantraniliprole.



Secções histológicas longitudinais da musculatura de voo de *S. postica*. A: controle negativo; B: clorantraniliprole 1 (CL1). SL: Secção longitudinal. Círculo: demarcação da área do núcleo. No software Fiji-ImageJ, a imagem foi ampliada para melhor delimitação do núcleo. Fonte: Autoria própria, 2024.

### **3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 9.0 (San Diego, Califórnia, EUA) utilizando para todas as análises o nível de significância de 5%.

Para a avaliação do tamanho dos núcleos, a área central das fotomicrografias foi demarcada utilizando o software Fiji-ImageJ. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de D'Agostino & Pearson, e, conforme a distribuição, aplicaram-se os testes estatísticos ANOVA/Tukey (para dados com distribuição normal) ou Kruskal-Wallis/Dunn (para dados sem distribuição normal).

### **4. RESULTADOS**

#### **4.1 Validação dos bioensaios**

Nos dois bioensaios realizados, a mortalidade média de *S. postica* no tratamento CP foi de 50% e 75%, enquanto para CN foi de 1,11%, e 5,0%, respectivamente. Dessa forma, tanto os bioensaios quanto os tratamentos (CP e CN) atenderam aos critérios estabelecidos pela OECD (2013), validando as condições experimentais.

#### **4.2 Análise histológica do músculo de voo em hematoxilina e eosina**

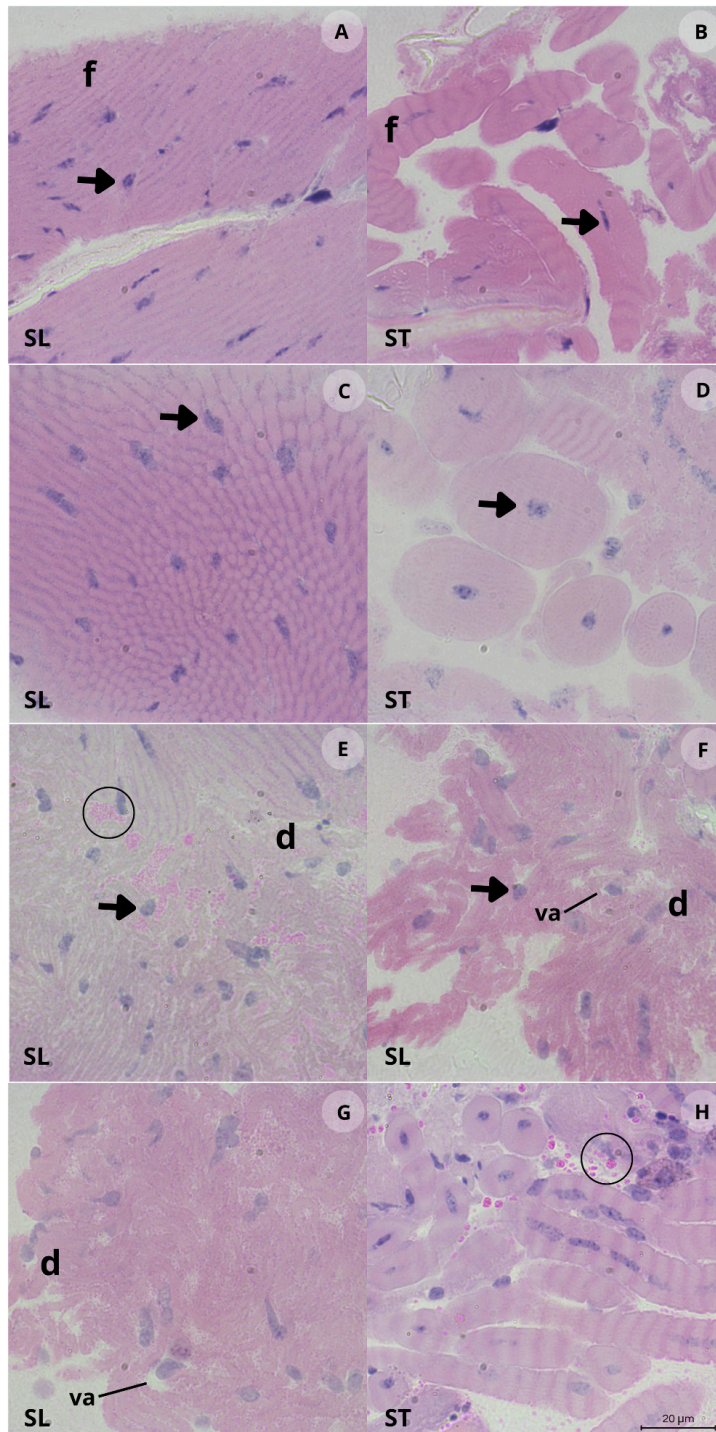
Nas secções transversais das fibras, foi possível observar o núcleo no centro da célula, corado com hematoxilina, enquanto os componentes do sarcoplasma foram localizados ao redor, corados com eosina. Nas secções longitudinais foi observada a presença de múltiplos núcleos e os sarcômeros, distribuídos ao longo da fibra muscular.

O tecido muscular obtido das abelhas do CN apresentou fibras organizadas, sem espaçamentos entre os sarcômeros e sem desorganização das fibras musculares (Figuras 3A e 3B). Além disso, os núcleos apresentaram-se com tamanho semelhante e coloração arroxeada marcada pela hematoxilina. Para o tratamento CA, é possível observar fibras organizadas (Figura 3C), porém os núcleos apresentaram-se com tamanhos maiores do que encontrado em CN, além de coloração mais clara (Figura 3D).

Nos tratamentos com o clorantraniliprole, CL1 (Figuras 3E e 3F) e CL2 (Figuras 3G e 3H), foram observados pontos focais de desorganização, com a presença de vacúolo nas fibras musculares. Ainda, houve alterações no tamanho e na coloração dos núcleos, que se apresentaram maiores e com coloração mais clara.

Durante as análises desses tratamentos, também foram observadas estruturas circulares, tanto na matriz extracelular das fibras musculares quanto nos locais de possível desorganização entre as fibras, sendo definidas provavelmente por hemócitos (Figuras 3E e 3H). Essas estruturas circulares apresentaram coloração variando de rosa intenso a rosa claro, exibindo refringência no citoplasma celular durante as análises microscópicas.

**Figura 3** - Seções histológicas do músculo de voo de *S. postica* expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com hematoxilina e eosina.



Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) - aumento de 1.000×. A e B: controle negativo. C e D: controle solvente. E e F: clorantraniliprole 1 (CL1 - 2,04 ng i.a./larva). G e H: clorantraniliprole 2 (CL2 - 0,204 ng i.a./larva). SL: secção longitudinal; ST: secção transversal; Setas: núcleos das fibras musculares; Círculo: hemócitos; f: fibras musculares; d: desorganização das fibras musculares; va: vacúolos. Fonte: Autoria própria, 2024.

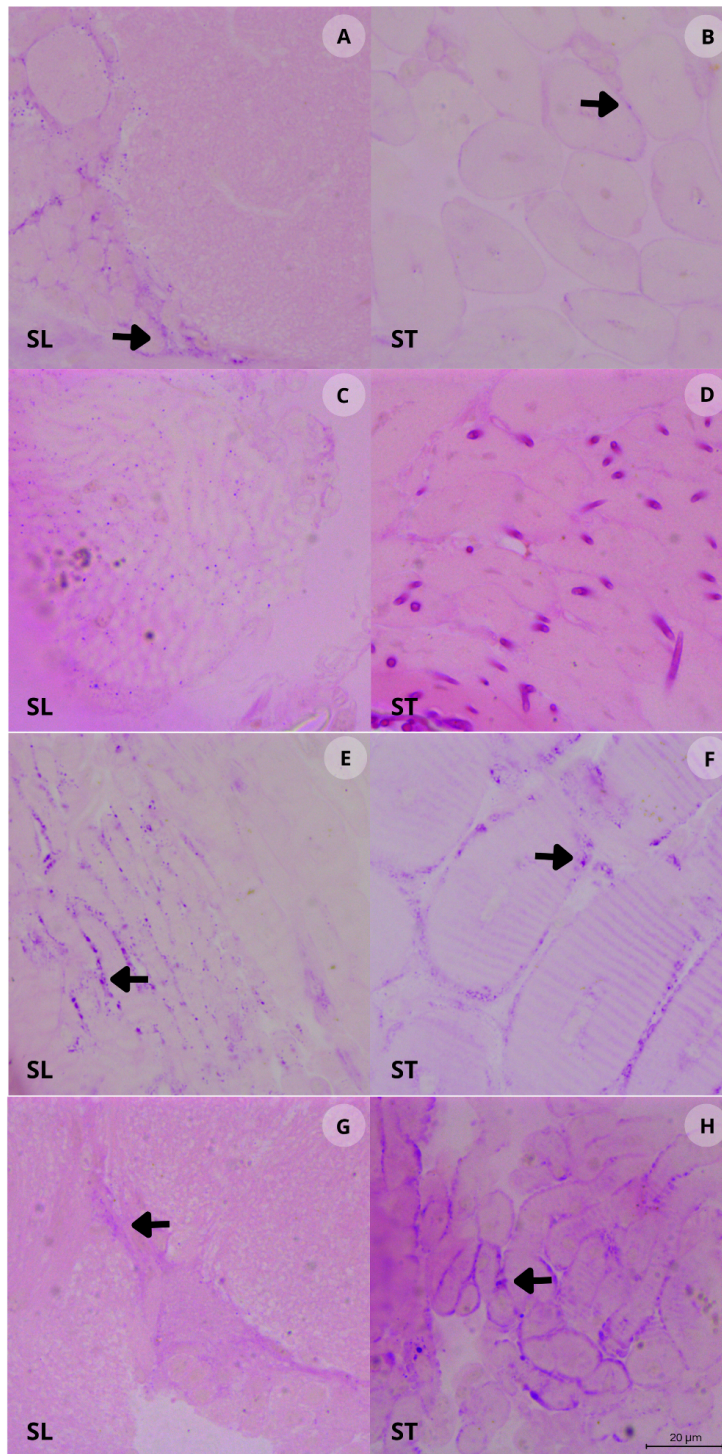
#### **4.2.2 Coloração com Ácido Periódico de Schiff**

A combinação das técnicas PAS e HE possibilitou uma análise comparativa das estruturas circulares previamente identificadas em HE. Foi possível observar algumas dessas estruturas com tamanho reduzido, localizadas ao redor das fibras musculares, indicando a presença de polissacarídeos.

Nos tratamentos CN e CA, a presença dessas estruturas foi mínima e pouco perceptível (Figuras 4A, 4B, 4C e 4D), enquanto nos tratamentos CL1 e CL2 tornaram-se mais evidentes, apresentando-se como estruturas arredondadas ao redor das fibras musculares (Figuras 4E, 4F, 4G e 4H).

Dessa forma, sugere-se que as estruturas evidenciadas na coloração HE não sejam compostas exclusivamente por polissacarídeos, pois também estão presentes nas fibras musculares.

**Figura 4** - Seções histológicas do músculo de voo de *S. postica* expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com Ácido Periódico de Schiff.



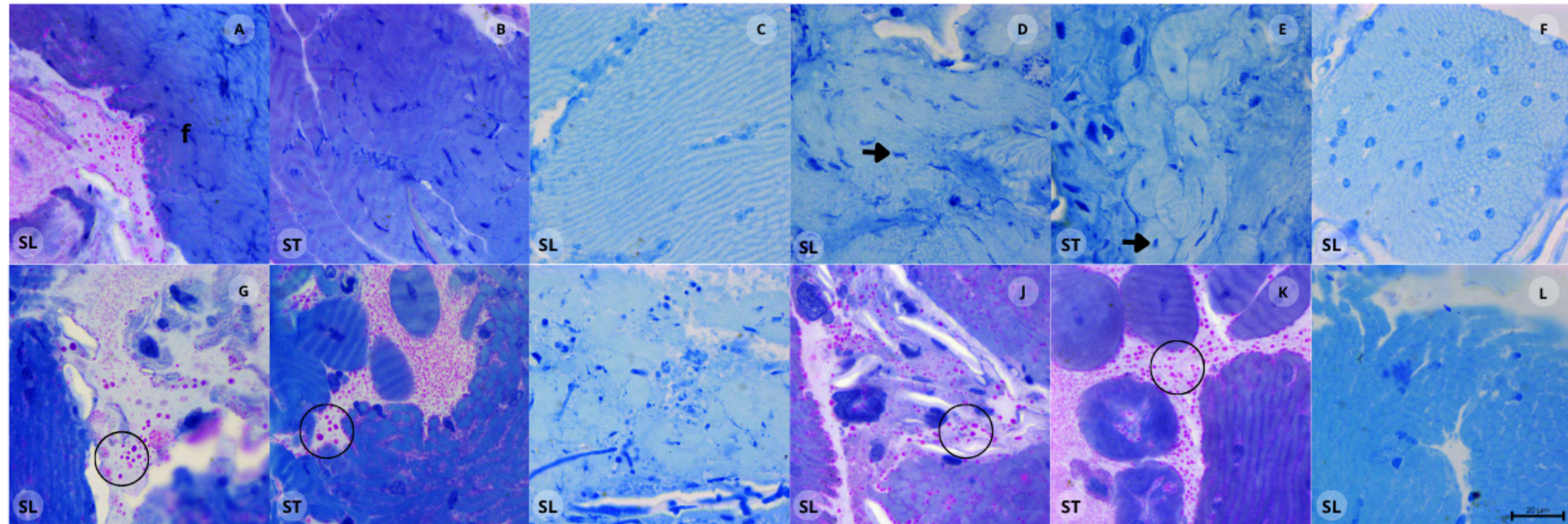
Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) - aumento de 1.000×. A e B: controle negativo. C e D: controle solvente. E e F: clorantraniliprole 1 (CL1 - 2,04 ng i.a./larva). G e H: clorantraniliprole 2 (CL2 - 0,204 ng i.a./larva). SL: secção longitudinal; ST: secção transversal; Setas: presença de polissacarídeos. Autoria própria, 2025.

### **4.2.3 Hematoxilina e Eosina contra corada com Azul de metileno em resina**

As análises histológicas com Azul de Metileno (AM) e HE, permitiram evidenciar as fibras musculares e os núcleos celulares corados em azul. No tratamento CN e CA, a presença das estruturas circulares foi pouco perceptível na maioria das amostras analisadas (Figuras 5A, 5B, 5D e 5E), assim como já observado nas análises coradas com HE. Em contrapartida, nos tratamentos CL1 (Figuras 5G e 5H) e CL2 (Figuras 5J e 5K), a maioria das fotomicrografias revelou essas estruturas arredondadas na matriz extracelular, e ao redor das fibras musculares, sendo muitas delas portadoras de núcleos, evidenciados pelo AM (Figura 6). A melhor visualização dessas estruturas nessas colorações deve-se, provavelmente, ao contraste proporcionado pelo AM, que corou as fibras musculares em azul, enquanto as demais estruturas permaneceram evidenciadas pela coloração HE.

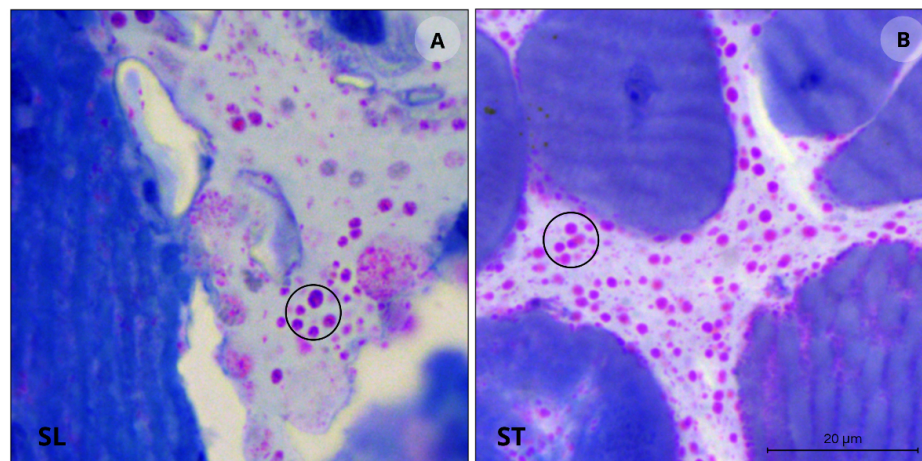
Vale destacar que, nas lâminas coradas exclusivamente com AM (Figuras 5C, 5F, 5I e 5L), essas estruturas circulares não foram observadas, sugerindo que sua visualização depende da coloração combinada com HE.

**Figura 5** - Secções histológicas do músculo de voo de *S. postica* expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval corado com Hematoxilina e Eosina e contra corado com Azul de Metileno.



A, B, D, E, G e H, J e K: Coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) com contracoloração com Azul de Metileno (AM). C, F, I e L: Coloração exclusiva com Azul de Metileno (AM). Aumento de 1.000×. A, B e C: controle negativo. D, E e F: controle solvente. G, H e I: cloranthraniliprole 1 (CL1 - 2,04 ng i.a./larva). J, K e L: cloranthraniliprole 2 (CL2 - 0,204 ng i.a./larva). SL: secção longitudinal; ST: secção transversal; Setas: núcleos das fibras musculares; círculo: estruturas circulares podendo indicar a presença de hemócitos; f: fibra muscular. Autoria própria, 2025.

**Figura 6** - Secções histológicas do músculo de voo de *S. postica* expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com hematoxilina, eosina e Azul de Metileno, em detalhe.



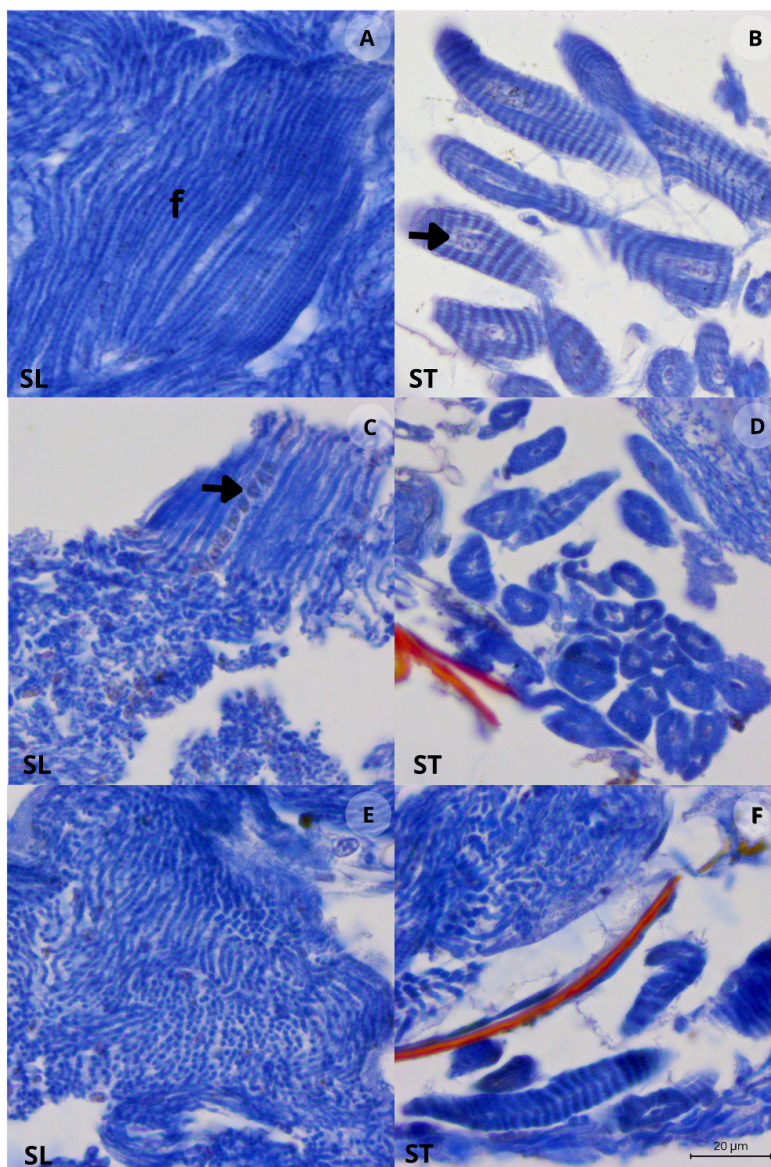
A: clorantraniliprole 1 (CL1); B: clorantraniliprole 2 (CL2). SL: secção longitudinal; ST: secção transversal; Círculo: hemócitos. No software Fiji-ImageJ, a imagem foi aumentada em um quadrante de 60x60 µm. Fonte: Autoria própria, 2025.

#### 4.2.4 Coloração Tricrômico de Mallory em parafina

Após a confecção das lâminas, esperava-se que as fibras musculares esqueléticas fossem coradas em vermelho e as fibras de colágeno em azul, conforme descrito na literatura. No entanto, observou-se que todas as fibras foram coradas em azul e alguns artefatos presentes nas lâminas apresentaram coloração vermelha, demonstrando a presença da coloração que marcaria as fibras. Embora os resultados indiquem que poderia existir muito colágeno presente nas fibras, mais análises precisam ser realizadas para elucidar melhor essas marcações.

Dessa maneira, embora os resultados não tenham sido os esperados, foram realizadas descrições das estruturas observadas, a fim de registrar e interpretar os achados histológicos. Nas secções, as fibras musculares foram coradas em azul, enquanto os núcleos foram marcados de azul escuro a preto. Nos tratamentos CL1 e CL2, devido à desorganização observada nas fibras musculares, os núcleos apresentaram-se dispersos ao longo das fibras e também com tamanhos maiores como observado na análise com HE. Nessa coloração de Tricrômico de Mallory, não foi possível identificar a origem das estruturas circulares encontradas na coloração com HE ao redor das fibras, uma vez que sua presença não foi observada nessa coloração.

**Figura 7** - Secções histológicas do músculo de voo de *S. postica* expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com Tricrômico de Mallory.



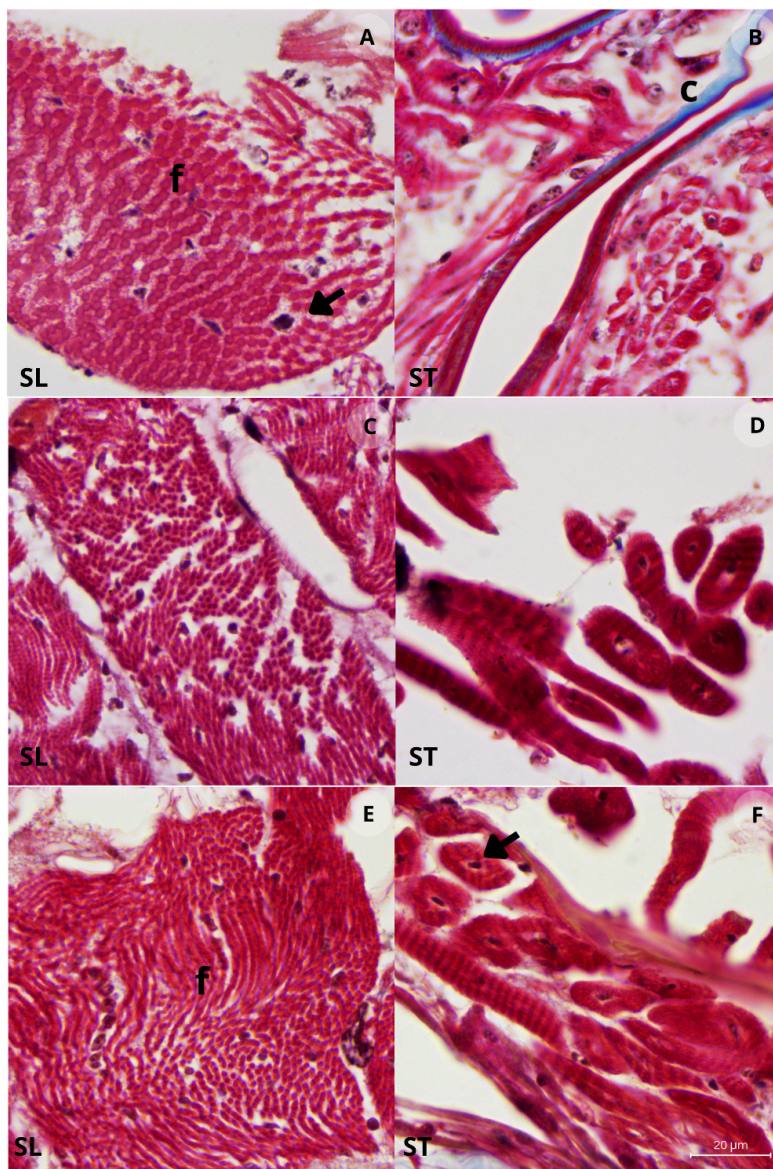
Coloração com Tricrômico de Mallory (MY) - aumento de 1.000×. A e B: controle negativo. C e D: clorantraniliprole 1 (CL1 - 2,04 ng i.a./larva). E e F: clorantraniliprole 2 (CL2 - 0,204 ng i.a./larva). SL: secção longitudinal; ST: secção transversal; Seta: núcleos das fibras musculares; f: fibra muscular. Autoria própria, 2025.

#### 4.2.5 Coloração Tricrômico de Masson em parafina

Na coloração com MN as fibras musculares foram coradas em vermelho, os núcleos em preto e o colágeno em azul. No entanto, a presença de colágeno não foi observada com frequência nos tratamentos, tendo apenas uma marcação em CN na Figura 8B. Dessa forma, as estruturas circulares também não puderam ser identificadas como colágeno. Assim como observado na coloração de HE e na de MY, os núcleos se apresentaram de tamanho

diferenciado nas fotomicrografias, mantendo os padrões maiores nos tratamentos com o clorantraniliprole (CL1 e CL2).

**Figura 8** - Secções histológicas do músculo de voo de *S. postica* expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval, corados com Tricrômico de Masson.



Coloração com Tricrômico de Masson (MN) - aumento de 1.000×. A e B: controle negativo. C e D: clorantraniliprole 1 (CL1 - 2,04 ng i.a./larva). E e F: clorantraniliprole 2 (CL2 - 0,204 ng i.a./larva). SL: secção longitudinal; ST: secção transversal; Seta: núcleos das fibras musculares; f: fibra muscular; c: colágeno. Autoria própria, 2025.

#### 4.3 Medições da área dos núcleos celulares nas lâminas histológicas

Os resultados de quantificação da área dos núcleos das fibras musculares, presentes nas lâminas histológicas coradas com HE, indicaram uma diferença significativa entre os tratamentos CN, CA, CL1 e CL2. Os tratamentos que continham clorantraniliprole (CL1 e

CL2) apresentaram aumento significativo em relação ao CN e a CA, mas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, sugerindo um efeito uniforme desse ingrediente ativo sobre a morfologia nuclear (Tabela 1).

**Tabela 1** - Resultados da medição da área dos núcleos avaliados nas fibras musculares de abelhas de *S. postica* expostas aos tratamentos durante o desenvolvimento larval.

|                          | CN                | CA                | CL1                | CL2                |
|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Área ( $\mu\text{m}^2$ ) | 4,28 $\pm$ 1,49 a | 8,56 $\pm$ 2,73 b | 15,68 $\pm$ 5,66 c | 19,58 $\pm$ 7,27 c |

Resultados apresentados como média e desvio padrão. CN: controle negativo; CA: controle do solvente; CL1: clorantraniliprole 1 (2,04 ng i.a./larva); CL2: clorantraniliprole 2 (0,204 ng i.a./larva). Fonte: Autoria própria, 2024.

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, as análises histológicas permitiram identificar os efeitos do ingrediente ativo clorantraniliprole na formação da musculatura de voo das abelhas *S. postica* expostas durante o desenvolvimento larval. As fibras musculares das abelhas expostas às duas concentrações subletais do clorantraniliprole (CL1 e CL2) revelaram pontos de desorganização, presença de vacúolos, alterações no tamanho e na coloração dos núcleos, além de estruturas que podem indicar a presença de hemócitos, revelando potenciais efeitos colaterais neste órgão não alvo. Os mesmos danos também foram observados em outros estudos, tanto na musculatura de voo (MAHMOUD; EL-AZIZ; SILEEM, 2020), cérebro, glândula hipofaríngea e intestino de abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) (EFROM *et al.*, 2012) quando exposta a inseticidas (IBRAHIM *et al.*, 2023), bem como no intestino médio da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner - Lepidoptera: Noctuidae), quando exposta ao clorantraniliprole (CASTRO *et al.*, 2021). Esses resultados indicam que os efeitos tóxicos são recorrentes em diferentes órgãos e espécies, reforçando o potencial dos agrotóxicos sob os insetos não alvos.

A presença de vacúolo em tecidos é um processo natural que ocorre nas células dos insetos (GRELLA *et al.*, 2019). No entanto, um aumento na quantidade destas estruturas, como observado nas fibras musculares após as exposições ao clorantraniliprole (CL1 e CL2), pode estar ligado à morte celular autofágica, desencadeada pelo excesso de radicais livres. Este efeito foi observado por Hu *et al.* (2019) no bicho-da-seda (*Bombyx mori* L. - Lepidoptera: Bombycidae) (LIU *et al.*, 2018), após exposição ao clorantraniliprole.

O estresse oxidativo é caracterizado pelo comprometimento de reações antioxidantes e pelo aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são moléculas altamente reativas que podem danificar células e tecidos. Esse desequilíbrio entre a produção de EROS e a capacidade celular de eliminá-las resulta em diversas alterações fisiológicas, incluindo danos a proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e lesões mitocondriais (DOS SANTOS *et al.*, 2024; PIZZINO *et al.*, 2017). O aumento da concentração intracelular de cálcio, por exemplo, pode comprometer o ajuste normal da função celular, existente como um sinal para a morte celular. Nesse contexto, alguns autores relatam que a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo retículo endoplasmático potencializa a morte celular causada pelo estresse oxidativo (DOS SANTOS *et al.*, 2024; DEJEANS *et al.*, 2010).

Esses processos celulares, desencadeados pelo estresse oxidativo, podem culminar em diferentes formas de morte celular, como a necrose ou a apoptose (FRIBERG; WIELOCH, 2002). A necrose, geralmente induzida por fatores externos, apresenta condensação da cromatina, como demonstrado por Gregorc e Ellis (2011) em abelhas exposta a agrotóxicos e por Silva-Zacarin, Taboga e Silva de Moraes (2008) em glândulas salivares larvais de *A. mellifera*. Em contrapartida, no presente estudo, foi observado um aumento significativo dos núcleos das fibras musculares nos tratamentos CA, CL1 e CL2, quando comparados ao CN.

De acordo com o trabalho de Li *et al.* (2024), o tamanho do núcleo pode ser influenciado por diversos fatores. O aumento na quantidade de DNA, por exemplo, pode contribuir para o aumento do volume nuclear, como ocorre em situações de poliploidia derivada da ação de xenobióticos. Além disso, tanto a quantidade quanto a estrutura da cromatina presente no núcleo desempenham funções importantes na regulação do tamanho nuclear, o que envolve alterações nas interações entre a lâmina nuclear e a cromatina (LI *et al.*, 2024).

Ren *et al.* (2020) descreveram a poliploidia como resultado de um endociclo, isto é, uma variação do ciclo celular que causa múltiplas rodadas de duplicação do genoma nuclear sem ocorrer a divisão celular. Embora Rangel *et al.* (2015) aponte que células poliploides são comuns no músculo de voo de *A. mellifera*, segundo Fang *et al.* (2023), em tecidos específicos, a formação de células poliploides pode ser associada com estresse celular mecânico ou metabólico, o que poderia ser a causa do observado para os tratamentos CA, CL1 e CL2.

Cópias extras do genoma podem favorecer a expressão de genes de detoxificação (REN *et al.*, 2020) e prevenir consequências desfavoráveis de mutações ou de danos ao DNA, aprimorando a responsividade celular frente ao estresse (FANG *et al.*, 2023). Deste modo, a

poliploidia se caracteriza como uma tentativa de o organismo aprimorar a detoxificação e a resistência ao danos ao DNA.

Ademais, Da Silva *et al.* (2025) demonstraram que as abelhas sem ferrão *Frieseomelitta varia* (Hymenoptera: Apidae), quando exposta a agrotóxicos, apresentou modulação na expressão de proteínas marcadoras de estresse (HSP70AB e HSP83) e de enzimas de desintoxicação (CYP9Q3, CYP6SA4 e CYTP450). Ainda, Kurma *et al.* (2022) demonstraram um aumento significativo na expressão de marcadores apoptóticos, como p53 e citocromo C, nas populações de *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) (CHAKRABARTI; SARKAR; BASU, 2018) expostas a combinação de um agrotóxico organofosforado, um piretroide sintético e um pesticida organoclorado. Dessa maneira, a exposição das abelhas aos agrotóxicos pode alterar significativamente a expressão gênica.

Eventualmente, os danos celulares induzidos por determinados agrotóxicos podem levar as células à morte, como evidenciado por Gregorc e Ellis (2011) em tecidos larvais de *A mellifera*. Embora não tenhamos avaliado a morte celular por marcadores específicos, sabe-se que a ruptura celular libera diversos constituintes no meio extracelular, os quais podem atrair hemócitos e desencadear uma resposta inflamatória (LOCKSHIN; ZAKERI, 2004). Esse processo pode estar relacionado à presença de estruturas circulares observadas nos tratamentos CL1 e CL2, sugerindo a atuação de hemócitos no meio extracelular.

Esses resultados estão de acordo com Fernandez-Winckler e Cruz-Landim (2008), que identificaram células intersticiais semelhantes e as classificaram, provavelmente, como hemócitos. Cruz-Landim (2009) ressalta que restos musculares são frequentemente fagocitados por granulócitos, o que poderia indicar a presença deles entre as fibras musculares e em seu entorno, devido ao acúmulo de células mortas.

Em geral, as abelhas apresentam seis diferentes tipos de hemócitos, sendo eles, pró-hemócitos, plasmócitos, granulócitos, esferulócitos, adipohemócitos e enocitóides (CHAPMAN, 1998), que desempenham diversas funções nos organismos, como fagocitose, encapsulamento, secreção de enzimas, coagulação da hemolinfa, citotoxicidade (SIVA-JOTHY; MORET; ROLFF, 2005; RIBEIRO; BHEHÉLIN, 2006) e cicatrização (KRAUTZ; AREFIN; THEOPOLD, 2014; DUBOVSKIY *et al.*, 2016). Ainda, corroborando com a possibilidade de estas estruturas serem hemócitos, outros estudos indicam que alguns hemócitos apresentam refringência quando observados em micrografia de contraste de luz (RIBEIRO; BHEHÉLIN, 2006; CRUZ-LANDIM, 2009; XIE *et al.*, 2011) e possuem diversas formas e tamanhos ((RIBEIRO; BHEHÉLIN, 2006). Cruz-Landim (2009) destaca que um dos mecanismos de resposta imune envolve a alteração no número de hemócitos, que são os

principais representantes da imunidade celular e podem ser encontrados tanto livres na hemolinfa quanto aderidos às paredes dos órgãos. Essas características ajudam a explicar a diferença na quantidade de hemócitos encontrados para abelhas dos tratamentos CN e CA em relação aos indivíduos dos tratamentos com clorotraniliprole (CL1 e CL2).

A coloração de PAS também possibilitou a identificação de polissacarídeos ao redor das fibras musculares, cuja presença foi detectada inclusive no grupo controle. De acordo com Cruz-Landim (2009), operárias imaturas para o voo apresentam esses compostos em quantidade reduzida, o que justifica essa observação. No entanto, nos tratamentos CL1 e CL2 foi observado um aumento na intensidade da marcação, levantando a hipótese de que as estruturas circulares poderiam ser compostas, em parte, por carboidratos. Resultado semelhante foi encontrado por Souza *et al.* (2025), que observaram acúmulo de polissacarídeos em larvas de bicho-mineiro (*L. coffeella*) após exposição ao clorotraniliprole. Por outro lado, Oliveira *et al.* (2024) verificaram uma diminuição em *A. mellifera* expostas ao inseticida teflubenzuron. Desse modo, sugere-se que os efeitos sobre os carboidratos possam variar conforme o tipo de inseticida, a espécie e o tecido avaliado. Essas divergências apontam para respostas fisiológicas distintas frente ao estresse induzido por agrotóxicos, sendo essa mobilização de carboidratos possivelmente associada à ativação de mecanismos antioxidantes e de defesa celular (DEJEANS *et al.*, 2010).

Embora o presente estudo não tenha analisado a capacidade de voo e a longevidade das abelhas expostas a esse ingrediente ativo, outros estudos demonstraram que após a exposição, as abelhas apresentaram alteração na capacidade de voo (GOMES *et al.*, 2020) e déficits locomotores duradouros (KADALA *et al.*, 2019). Como consequência, essas alterações levam ao forrageamento ineficiente, comprometendo o armazenamento de recursos alimentares, alterações no comportamento e no desempenho das funções executadas por cada indivíduo dentro da colônia (SANDROCK *et al.* 2014, WILLIAMS; SWALE; ANDERSON, 2020). Além disso, pode ocorrer uma maior suscetibilidade a patógenos (SÁNCHEZ-BAYO *et al.*, 2016), comprometendo a sobrevivência de toda a colônia (STANLEY; SMITH; RAINE, 2015 ).

Os efeitos do clorotraniliprole sobre a musculatura de voo ressaltam a importância de mais estudos sobre os impactos subletais de agrotóxicos em polinizadores. A integridade desse tecido é essencial para o forrageamento eficiente, pois qualquer alteração pode afetar a dinâmica da colônia e sua resistência a desafios ambientais. Pesquisas que investigam esses impactos são fundamentais para entender os riscos envolvidos e contribuir para a conservação de polinizadores nativos, essenciais para os ecossistemas e a produtividade agrícola.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que o clorantraniliprole, nas duas concentrações testadas (CL1 e CL2), causou danos na musculatura de voo de *S. postica*, resultando em desorganização das fibras musculares, vacuolização e morte celular. Além disso, induziu aumento significativo da área nuclear. Esses efeitos podem ter contribuído para o aparecimento de hemócitos nas fibras musculares, além do acúmulo de polissacarídeos, evidenciando impactos negativos desse inseticida nas abelhas sem ferrão. Esses achados reforçam a necessidade de aprofundar as investigações sobre os efeitos histopatológicos de agrotóxicos em espécies nativas, contribuindo para a construção de estratégias mais seguras e sustentáveis para o uso desses compostos na agricultura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADADE, C. M.; CRUZ-LANDIM, C. Diferenciação e envelhecimento do músculo do vôo em operárias de *Scaptotrigona postica* Latreille (Hymenoptera, Apidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, p. 379-384, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752004000200036>.

BPBES. **Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil**. 1 ed. São Carlos/SP: Editora Cubo, 1 ed., p. 1-93, 2019. <http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>.

CASTRO, B. M. C. *et al.* Exposure to chlorantraniliprole reduces locomotion, respiration, and causes histological changes in the midgut of velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemosphere**, v. 263, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128008>

CHAKRABARTI, P.; SARKAR, S.; BASU, P. Field Populations of Wild *Apis cerana* Honey Bees Exhibit Increased Genetic Diversity Under Pesticide Stress Along an Agricultural Intensification Gradient in Eastern India. **Journal of Insect Science**, v 18, ed. 3, 2018. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iey042>

CHAPMAN, R. F. The insects: structure and function. **Cambridge University Press**, ed. 5, p. 121-128, 1998.

CORREA-FERNANDEZ, F.; CRUZ-LANDIM, C. Differential flight muscle development in workers, queens and males of the eusocial bees, *Apis mellifera* and *Scaptotrigona postica*. **Journal of Insect Science**, v. 10, ed. 1, 2010. <https://doi.org/10.1673/031.010.8501>

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009. ISBN 978-85-393-0430-1.

DA SILVA, J. A. *et al.* Sublethal pesticide exposure alters stress response, detoxification, and immunity gene expression in larvae of the stingless bee *Frieseomelitta varia* (Apidae):

Meliponini). **Environmental Science and Pollution Research**, 1-10, 2025.  
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-025-36111-1>

DEJEANS, N. *et al.* Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 9, p. 1221-1230, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.12.009>

DU, J.; FU, Y. Diamide insecticides targeting insect ryanodine receptors: Mechanism and application prospect. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 670, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.05.107>.

DUBOVSKIY, I. *et al.* Encapsulation and nodulation in insects. **Invertebrate Survival Journal**, p. 229 – 246, 2016.  
[https://www.researchgate.net/publication/305294331\\_Encapsulation\\_and\\_nodulation\\_in\\_insects](https://www.researchgate.net/publication/305294331_Encapsulation_and_nodulation_in_insects)

DOS SANTOS, Y. B. *et al.* Inseticidas de diamida e seus efeitos sobre mamíferos diamide insecticides and their effects on mammals. In: NETO, O.B. *et al.* (Orgs). **Ciências Biológicas e da Saúde: integrando saberes em diferentes contextos**, 2024, v. 7, ed. 1. p. 148 - 159, São Carlos: Editora Científica Digital.  
<https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/240717181.pdf>

EFROM, C. F. S. *et al.* Side-effects of pesticides used in the organic system of production on *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. **Agriculture, Agribusiness and Biotechnology**, v. 55, ed. 1, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000100005>

FANG, J. *et al.* Cellular polyploidy in organ homeostasis and regeneration. **Protein & Cell**, v. 14, ed. 8, p. 560–578, 2023. <https://doi.org/10.1093/procel/pwac064>

FERNANDEZ, F. C.; CRUZ-LANDIM, C.; MALASPINA, O. Influence of the Insecticide Pyriproxyfen on the Flight Muscle Differentiation of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 75, n. 6, p. 844 - 848, 2012.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.22003>

FERNANDEZ-WINCKLER, F.; CRUZ-LANDIM, C. A morphological view of the relationship between indirect flight muscle maturation and the flying needs of two species of advanced eusocial bees. **Micron**, v. 39, ed. 8, p. 1235-1242, 2008.  
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.04.004>

FISCHER, I.; MILTON, C.; WALLACE, H. Toxicity testing is evolving!. **Toxicology Research**, v. 9, n. 2, p. 67 – 80, 2020. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa011>

FMC. [Bula]. Grânulos Dispersíveis em Água (WG) . Campinas, FMC Química do Brasil Ltda., 29 de março de 2021.  
<https://fmcagrica.com.br/Content/Fotos/Bula%20-%20Altacor.pdf>.

FRIBERG, H.; WIELOCH, T. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. **Biochimie**, v. 84, n. 2-3, p. 241-250, 2002.  
<https://doi.org/10.3390/cells13070648>

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas colorido de histologia**. Editora Guanabara Koogan Ltda. Rio de Janeiro, ed. 6, 1943.

GITIRANA, L. B. Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos. **Editora Autora**, Rio de Janeiro, p. 1 - 231, 2024.

GOMES, N. I. *et al.* Honeybee survival and flight capacity are compromised by insecticides used for controlling melon pests in Brazil. **Ecotoxicology** v. 29, p. 97–107, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02145-8>

GOMES, I. N. *et al.* The survival and flight capacity of commercial honeybees and endangered stingless bees are impaired by common agrochemicals. **Ecotoxicology**, v. 32, 2023. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-023-02699-8>

GREGORC, A.; ELLIS, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, ed. 2, p. 200- 207, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.12.005>

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

HU, J., *et al.* The mechanism of damage in the midgut of *Bombyx mori* after chlorantraniliprole exposure. **Ecotoxicologia** v. 28 , p. 903–912, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02089-z>

IBRAHIM, E. D.S., *et al.* Sulfoxaflor influences the biochemical and histological changes on honeybees (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology**, v. 32, p. 674–681, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02677-0>

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. Bees, ecosystem services and the Brazilian Forest Code. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032010000400008>

IPBES. **O relatório de avaliação do Intergovernmental Science-Plataforma de Políticas sobre Biodiversidade e Serviços Ecossistêmicos sobre polinizadores, polinização e produção de alimentos**. 2016. [https://www.bpb.es.net/wp-content/uploads/2019/03/BPBES\\_CompletoPolinizacao-2.pdf](https://www.bpb.es.net/wp-content/uploads/2019/03/BPBES_CompletoPolinizacao-2.pdf)

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo/SP: Santos, ed. 1, p. 123, 1983.

KADALA, A. *et al.* Honey bees long-lasting locomotor deficits after exposure to the diamide chlorantraniliprole are accompanied by brain and muscular calcium channels alterations. **Scientific Reports**, v. 9, n. 2153, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39193-3>

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Editora Abraham, Rio de Janeiro, ed. 4, 2016.

KRAUTZ, R.; AREFIN, B.; THEOPOLD, U. Damage signals in the insect immune response. **Plant Science**, v. 5, p. 1–11, 2014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00342>.

KURMA, D. *et al.* Oxidative stress and apoptosis in Asian honey bees (*A. cerana*) exposed to multiple pesticides in intensive agricultural landscape. **Apidologie**, v. 53, n. 25, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00929-2>

LAHM, G. P. *et al.* Rynaxypyre: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 6274–6279, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.09.012>.

LI, Y. *et al.* Nuclear Structure, Size Regulation, and Role in Cell Migration. **Cells**, v. 13, ed. 24, 2024. <https://doi.org/10.3390/cells13242130>

LIU, Y. *et al.* Combined toxicity of chlorantraniliprole, lambda-cyhalothrin, and imidacloprid to the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 22598–22605, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2374-7>

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Apoptosis, autophagy, and more. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, ed. 12, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.011>

MAHMOUD, E. A.; EL-AZIZ, M. F. A.; SILEEM, T. M. Ultrastructure deformation of flight muscles and bioenergetics changes in honey bee workers treated with pesticides. **Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications**, v. 53, ed. 4, p. 53-63, 2020. [10.21608/ajnsa.2020.21369.1315](https://doi.org/10.21608/ajnsa.2020.21369.1315)

MONTANARI, T. **Histologia : texto, atlas e roteiro de aulas práticas**. Porto Alegre, ed. 3, p. 229, 2016. <https://www.ufrgs.br/livrodehisto/pdfs/livrodehisto.pdf>.

NICHOLLS, E.; HEMPEL DE IBARRA, N. Assessment of pollen rewards by foraging bees. **Functional Ecology**, 2017. [https://www.researchgate.net/publication/309746892\\_Assessment\\_of\\_pollen\\_rewards\\_by\\_foraging\\_bees](https://www.researchgate.net/publication/309746892_Assessment_of_pollen_rewards_by_foraging_bees)

NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. **Protocolo para testes de toxicidade de substâncias químicas em abelhas sem ferrão: teste de toxicidade por contato**. [s.d.].

OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development. **Test nº 237: Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, single exposure**. (Diretrizes da OCDE para o Teste de Produtos Químicos, Seção 2). 2013. <https://doi.org/10.1787/9789264203723-en>

OLIVEIRA, M.S.D., *et al.* Effects of chronic oral exposure to insecticide teflubenzuron on the midgut of the honey bee *Apis mellifera* workers: histopathological insights into pesticide toxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, p. 44908–44919, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-34066-3>

PIZZINO, G., *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>

RANGEL, J. *et al.* Endopolyploidy changes with age-related polyethism in the honey bee, *Apis mellifera*. **PLoS One**, v. 10, 2015. 10.1371/journal.pone.0122208

REN, D. *et al.* Regulatory Mechanisms of Cell Polyploidy in Insects. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 29, ed. 8, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00361>

RECH, A. R. *et al.* Biologia da polinização. **Editora Projeto Cultural**, Rio de Janeiro, ed. 1, 2014.  
[https://ava.icmbio.gov.br/pluginfile.php/4592/mod\\_data/content/16765/biologia%20da%20poliniza%C3%A7%C3%A3o%202014.pdf](https://ava.icmbio.gov.br/pluginfile.php/4592/mod_data/content/16765/biologia%20da%20poliniza%C3%A7%C3%A3o%202014.pdf)

RIBEIRO, C.; BREHÉLIN, M. Insect haemocytes: What type of cell is that? **Journal of Insect Physiology**, v. 52, ed. 5, p. 417-429, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>

ROSSI-BATIZ, M.; REVUELTA, M.; GÓMEZ-DE-SARAVIA, S. Acción biocida de aceites esenciales frente al insecto plaga *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista Chilena de Entomología**, v. 51, n. 1, 2025.  
<https://www.biotaxa.org/rce/article/view/86961>

SÁNCHEZ-BAYO, F. *et al.* Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. **Environment International**, v. 89–90, p. 7-11, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009>.

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. **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**, p. 696 - 703, 2012.  
[https://www.researchgate.net/profile/Marie-Pierre-Chauzat/publication/284581891\\_Protocol\\_for\\_optimization\\_of\\_histological\\_histochemical\\_and\\_immunohistochemical\\_analyses\\_of\\_larval\\_tissues\\_application\\_to\\_histopathology\\_of\\_honey\\_bee/links/64f9d5b605a98c1b63fa3305/Protocol-for-optimization-of-histological-histochemical-and-immunohistochemical-analyses-of-larval-tissues-application-to-histopathology-of-honey-bee.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Marie-Pierre-Chauzat/publication/284581891_Protocol_for_optimization_of_histological_histochemical_and_immunohistochemical_analyses_of_larval_tissues_application_to_histopathology_of_honey_bee/links/64f9d5b605a98c1b63fa3305/Protocol-for-optimization-of-histological-histochemical-and-immunohistochemical-analyses-of-larval-tissues-application-to-histopathology-of-honey-bee.pdf)

SANDROCK, C. *et al.* Impact of Chronic Neonicotinoid Exposure on Honeybee Colony Performance and Queen Supersedure. **PLoS ONE**, 2014.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103592>

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

SMITH, D. S. The structure of insect fibrillar flight muscle: A study made with special reference to the membrane systems of the fiber. **Biophys and Biochem Cytol**, v. 10, ed. 4, p. 123–158, 1961. <https://doi.org/10.1083/jcb.10.4.123>

SIVA-JOTHY, M. T.; MORET, Y.; ROLFF, J. Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. **Advances in Insect Physiology**, v. 32, p. 1-48, 2005, [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(05\)32001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7).

SOUZA, D. S. *et al.* Hidden target, hidden effects: chlorantraniliprole on the coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*). **Ecotoxicology**, v. 34, p. 412–424, 2025. <https://doi.org/10.1007/s10646-024-02845-w>

STANLEY, D. A.; SMITH, K. E.; RAINE, N. E. Bumblebee learning and memory is impaired by chronic exposure to a neonicotinoid pesticide. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep16508>

TOLEDO-HERNÁNDEZ, E. *et al.* The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. **Apidologie**, v. 53, n°. 8, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00913-w>

TOMÉ, H.V.V. *et al.* Frequently encountered pesticides can cause multiple disorders in developing worker honey bees. **Environmental Pollution**, v. 256, n. 113420, 2020. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749119311534>.

TOPPA, R. H. *et al.* Impact of glues used for RFIDs on the longevity and flight muscles of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Apidae: Meliponini). **Apidologie**, v. 52, p. 328–340, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00823-9>

WEN, X. *et al.* Pesticide residues in the pollen and nectar of oilseed rape (*Brassica napus* L.) and their potential risks to honey bees. **Science of The Total Environment**, v. 786, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147443>

WILLIAMS, J. R.; SWALE, D. R.; ANDERSON, T. D. Comparative effects of technical-grade and formulated chlorantraniliprole to the survivorship and locomotor activity of the honey bee, *Apis mellifera* (L.). **Pest Management Science**, v. 76, p. 2582–2588, 2020. <https://doi.org/10.1002/ps.5832>

XIE, Y., *et al.* Morphology and phagocytic ability of hemocytes from *Cristaria plicata*. **Aquaculture**, v. 310, ed. 3–4, p. 245-251, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.09.034>.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo teve como objetivo avaliar se abelhas da espécie *S. postica*, expostas a duas concentrações subletais do inseticida clorotraniliprole, durante a fase larval, apresentariam alterações no desenvolvimento, na morfometria pós-emergência e na integridade da musculatura de voo de abelhas adultas recém-emergidas.

Nas duas concentrações testadas (CL1 e CL2), o clorotraniliprole não induziu mortalidade larval, inibição da taxa de pupação e emergência nas abelhas expostas. Quanto às análises de mortalidade em cada estágio de desenvolvimento (5<sup>o</sup>I, DF, PP, PR, PM, PP, EM), apenas CP apresentou diferença estatística dos demais tratamentos. Desse modo, tanto o tratamento CN quanto o CA apresentaram-se estatisticamente iguais às duas concentrações do ingrediente ativo clorotraniliprole.

Além disso, na análise realizada em relação ao estágio anterior do mesmo tratamento, CN, CA e CL1 não apresentaram diferença significativa entre os estágios. Porém, CL2 não mostrou diferença no estágio de DF para o estágio de 5<sup>o</sup>I e de EM para PP, mas apresentou diferença de DF para PB e de PR para PM, indicando influência do ingrediente ativo nessas duas etapas do desenvolvimento.

Para concluir as análises dos estágios de desenvolvimento, a EM das abelhas foi comparada ao estágio inicial de desenvolvimento, o 5<sup>o</sup>I. Os resultados demonstraram diferenças significativas nos tratamentos CA e CL2, o que corrobora o resultado da curva de sobrevivência, em que ambos diferiram de CN. Esses resultados indicam que o tratamento não influencia o início do desenvolvimento, mas, ao final, na emergência do adulto, pode haver diminuição na prole da colônia.

Em relação aos marcos, observados em dias, os resultados obtidos evidenciam que o desenvolvimento larval e pupal das abelhas foi afetado de maneira diferenciada pelos tratamentos. Embora o tempo necessário para alcançar o quinto ínstar (5<sup>o</sup>I) tenha sido semelhante em todos os tratamentos, diferenças foram observadas a partir da fase de defecação e nos estágios subsequentes. O tratamento CP apresentou um atraso em todas as fases do desenvolvimento, reforçando sua influência negativa no ciclo de vida das abelhas. Além disso, os tratamentos CL1 e CL2, apesar de não apresentarem um atraso tão acentuado, demonstraram uma tendência ao prolongamento do período de desenvolvimento em comparação ao CN.

Os resultados da medição da largura da cabeça (MC) e da distância intertegular (MI) indicaram diferenças significativas entre os tratamentos. Observou-se um aumento significativo na MC para os indivíduos do tratamento CL1 e um aumento significativo na MI para os indivíduos do tratamento CL2, em comparação com os demais tratamentos.

Os resultados histológicos do presente estudo demonstram que o clorantraniliprole, nas duas concentrações testadas (CL1 e CL2), causou danos à musculatura de voo. Foram observados pontos focais de desorganização, com a presença de vacúolo nas fibras musculares e alterações no tamanho e na coloração dos núcleos, que se apresentaram maiores e com coloração mais clara. Também foram observadas, nesses tratamentos, estruturas circulares, tanto na matriz extracelular das fibras musculares, quanto nos locais de possível desorganização das fibras, sugerindo provavelmente a presença de diferentes tipos de hemócitos.

Conclui-se que, embora o clorantraniliprole não tenha induzido mortalidade larval, inibição da taxa de pupação e emergência nas abelhas expostas, ele pôde influenciar negativamente o desenvolvimento e a formação pós-emergência, como a largura da cabeça e distância intertegular. Além disso, induziu danos significativos na formação da musculatura de voo, tão importante para a atividade de forrageamento.

Portanto, estudos sobre a toxicidade dos agrotóxicos devem considerar os diferentes estágios de desenvolvimento das abelhas, incluindo as espécies nativas, dada a ampla aplicação desses compostos na agricultura para o controle de pragas, impactando os organismos não-alvo.