

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL

FELIPE LISSONI DE ANDRADE NOGUEIRA

**Efeito subletal do fipronil sobre o Sistema Hepatonefrocítico de *Bombus atratus*
(SWEDERUS, 1787) (HYMENOPTERA BOMBINI).**

Sorocaba

2025

FELIPE LISSONI DE ANDRADE NOGUEIRA

**Efeito subletal do fipronil sobre o Sistema Hepatonefrocítico de *Bombus atratus*
(SWEDERUS, 1787) (HYMENOPTERA BOMBINI).**

Trabalho de Conclusão de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos. Área de Concentração: Ciências Biológicas.

Orientação: Dr. Fábio Camargo Abdalla

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), processo: 88887.612499/2021-00.

Sorocaba

2025

Nogueira, Felipe Lissoni de Andrade

Efeito subletal do fipronil sobre o Sistema Hepatonefrocítico de *Bombus atratus* (SWEDERUS, 1787) (HYMENOPTERA BOMBINI).

/ Felipe Lissoni de Andrade Nogueira – 2025

184f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Fábio Camargo Abdalla

Banca Examinadora: Glenda Samara Dias Santos, Paulo José Bálamo, Monica Jones Costa, Elaine Cristina Mathias da Silva

Bibliografia

1. Sistema Hepatonefrocítico 2. Fipronil 3. *Bombus atratus*

I. Nogueira, Felipe Lissoni de Andrade II. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

FELIPE LISSONI DE ANDRADE NOGUEIRA

Trabalho de Conclusão de Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos. Sorocaba, 15 de abril de 2025.

Orientador

Dr. Fábio Camargo Abdalla

Universidade Federal de São Carlos

Examinadora

Dra. Glenda Samara Dias Santos

Universidade Federal de Viçosa

Examinador

Dr. Paulo José Bálamo

Faculdade de Tecnologia de Sorocaba

Examinadora

Dra Monica Jones Costa

Universidade Federal de São Carlos

Examinador

Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva

Universidade Federal de São Carlos

RESUMO

A polinização realizada por espécies de abelhas nativas do gênero *Bombus* é fundamental para garantir a reprodução sexuada das plantas e a segurança alimentar humana. Entretanto, essas abelhas encontram-se em declínio populacional devido à diversos fatores, incluindo a exposição a doses subletais de agrotóxicos. O fipronil é um agrotóxico com ação inibitória sobre os receptores pós-sinápticos neuronais, causando estimulação excessiva de neurônios no sistema nervoso dos insetos. A pesquisa considerou que concentrações subletais de fipronil encontradas em campo e utilizadas em sistemas agrícolas poderiam prejudicar o organismo de *Bombus atratus*. Assim, a pesquisa analisou os efeitos de concentrações subletais de fipronil, $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, sobre as células do sistema hepatonefrocítico (SHN) de *B. atratus*, por meio da utilização de biomarcadores. Dessa forma, foram realizadas análises morfológicas, morfométricas, genotóxicas, histoquímicas de fluorescência e histoquímicas de trofócitos, enócitos e células pericárdicas. Os resultados indicaram as concentrações de fipronil analisadas prejudicaram os grupos celulares analisados do SHN de *B. atratus*, com efeitos mais brandos no tratamento de $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e acentuados exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$. As exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ causaram danos de intensidade similar sobre as células do SHN de *B. atratus*. A análise morfológica dos trofócitos indicou perda da forma nuclear ramificada em todas as concentrações analisadas, enquanto as exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ causaram vacuolização citoplasmática e compactação da cromatina. Os enócitos apresentaram compactação da cromatina em todas as concentrações analisadas. As células pericárdicas apresentaram vacuolização citoplasmática, foram observadas em estágios II e III de ativação e apresentaram compactação da cromatina em todas as concentrações analisadas. A análise morfométrica indicou diminuição da área celular dos trofócitos e enócitos dos grupos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$), enquanto as células pericárdicas apresentaram aumento da área celular em todas as exposições analisadas ($P < 0,0001$) devido a atividade pinocítica da hemolinfa e vacuolização do citoplasma. A análise genotóxica indicou que todas as concentrações analisadas prejudicaram o material genético das células, com maior intensidade em relação às exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$). A análise histoquímica de fluorescência indicou que as exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ causaram fragmentação da cromatina em todos os grupos celulares analisadas, indicado pelos núcleos vermelhos observados. As análises histoquímicas indicaram que o conteúdo de proteínas diminuiu em trofócitos e células pericárdicas, permanecendo inalterados nos enócitos, em todas as concentrações analisadas. Os conteúdos de glicogênio e triglicerídeos permaneceram inalterados em todos os tratamentos e grupos celulares analisados. Os resultados indicaram que a ação do fipronil prejudicou a mobilização de moléculas, prejudicando o metabolismo energético das abelhas dos grupos expostos. A pesquisa concluiu que a ação dos efeitos de concentrações subletais de fipronil encontradas em campo prejudicaram as células do SHN e o organismo de *B. atratus*.

Palavras-chave: ecotoxicologia; agrotóxicos; biomarcadores; abelhas nativas brasileiras.

ABSTRACT

Pollination by native bee species of the genus *Bombus* is essential for ensuring the sexual reproduction of plants and human food security. However, these bees are experiencing population decline due to several factors, including exposure to sublethal doses of pesticides. Fipronil is an agrochemical with inhibitory action on neuronal postsynaptic receptors, causing excessive stimulation of neurons in the insect's nervous system. The study found that sublethal concentrations of fipronil found in the field and used in agricultural systems could harm the organism of *Bombus atratus*. Therefore, the study analyzed the effects of sublethal concentrations of fipronil ($1.5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2.5 \mu\text{L L}^{-1}$, and $3.5 \mu\text{L L}^{-1}$) on the cells of the hepatonephrocytic system (HNS) of *B. atratus*, using biomarkers. Therefore, morphological, morphometric, genotoxic, fluorescence histochemical, and histochemical analyses of trophocytes, oenocytes, and pericardial cells were performed. The results indicated that the analyzed fipronil concentrations damaged the analyzed cell groups of the SHN of *B. atratus*, with milder effects in the treatment of $1.5 \mu\text{L L}^{-1}$ and accentuated exposures to $2.5 \mu\text{L L}^{-1}$ and $3.5 \mu\text{L L}^{-1}$. Exposures to $2.5 \mu\text{L L}^{-1}$ and $3.5 \mu\text{L L}^{-1}$ caused damage of similar intensity to the SHN cells of *B. atratus*. Morphological analysis of the trophocytes indicated loss of the branched nuclear shape at all analyzed concentrations, while exposures to $2.5 \mu\text{L L}^{-1}$ and $3.5 \mu\text{L L}^{-1}$ caused cytoplasmic vacuolization and chromatin compaction. Oenocytes showed chromatin compaction at all concentrations analyzed. Pericardial cells showed cytoplasmic vacuolation, were observed in stages II and III of activation, and showed chromatin compaction at all concentrations analyzed. Morphometric analysis indicated a decrease in the cell area of trophocytes and oenocytes in the groups exposed to $2.5 \mu\text{L L}^{-1}$ and $3.5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0.0001$), while pericardial cells showed an increase in cell area at all exposures analyzed ($P < 0.0001$) due to pinocytic activity of the hemolymph and vacuolation of the cytoplasm. Genotoxic analysis indicated that all concentrations analyzed damaged the genetic material of the cells, with greater intensity in relation to exposures to $2.5 \mu\text{L L}^{-1}$ and $3.5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0.0001$). Fluorescence histochemical analysis indicated that exposure to $2.5 \mu\text{L L}^{-1}$ and $3.5 \mu\text{L L}^{-1}$ caused chromatin fragmentation in all cell groups analyzed, as indicated by the observed red nuclei. Histochemical analyses indicated that protein content decreased in trophocytes and pericardial cells, while remaining unchanged in oenocytes, at all concentrations analyzed. Glycogen and triglyceride contents remained unchanged in all treatments and cell groups analyzed. The results indicated that fipronil's action impaired the mobilization of molecules, impairing the energy metabolism of bees in the exposed groups. The study concluded that the effects of sublethal fipronil concentrations found in the field harmed HNS cells and the *B. atratus* organism.

Keywords: ecotoxicology; pesticides; biomarkers; Brazilian native bees.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. ABELHAS COMO BIOINDICADORAS DA QUALIDADE AMBIENTAL	9
1.2. SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS E A POLINIZAÇÃO.....	11
1.3. AÇÃO ANTRÓPICA SOBRE OS SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS	14
1.4. CONSERVAÇÃO DAS ABELHAS NATIVAS	17
2. CAPÍTULO 1 – AS ABELHAS DO GÊNERO <i>BOMBUS</i> EM PESQUISAS ECOTOXICOLÓGICAS....	19
2.1. INTRODUÇÃO	21
2.2. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.2.1. Biologia Geral das Abelhas do Gênero <i>Bombus</i>	23
2.2.2. Organização Social Do Gênero <i>Bombus</i>	24
2.2.3. Ciclo das Colônias de <i>Bombus</i>	26
2.2.4. Importância Econômica e Ecológica de Abelhas do Gênero <i>Bombus</i>.....	26
2.2.5. Declínio de Populações de Abelhas Nativas	28
2.2.6. Ecotoxicologia	32
2.2.7. Escassez de Trabalhos Ecotoxicológicos com Abelhas do Gênero <i>Bombus</i>	34
2.2.8. Fipronil.....	39
2.2.9. Rota de Exposição	43
2.2.10. Avaliações de Risco	46
2.2.11. Sistema Hepatonefrocítico	50
2.2.12. Biomarcadores de Efeito.....	55
2.2.13. Concentrações de Fipronil Estimadas em Campo.....	56
2.2.14. Objetivos	57
REFERÊNCIAS.....	58
3. CAPÍTULO 2 – MÚLTIPLOS BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS DO FIPRONIL SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA HEPATONEFROCÍTICO.....	69
3.1. INTRODUÇÃO	71
3.2. REVISÃO DA LITERATURA.....	72
3.2.1. Análises Morfológica e Morfométrica	72
3.2.2. Análise Genotóxica	72
3.2.3. Análise Histoquímica de Fluorescência	75
3.2.4. Análises Histoquímicas	76
3.2.5. Objetivos	78
3.3. MATERIAL E MÉTODOS	79
3.3.1. Delineamento Experimental	79
3.3.1.1. Local de Coleta	79
3.3.1.2. Coleta das Abelhas.....	80
3.3.1.3. Exposição ao Fipronil.....	80

3.3.1.4. Dissecção do Vaso Dorsal.....	83
3.3.2. Análise Morfológica – Hematoxilina e Eosina	84
3.3.2.1. Preparo do Material e Emblocamento em Histoiresina	84
3.3.2.2. Técnica de Coloração Hematoxilina e Eosina	84
3.3.3. Análise Morfométrica	85
3.3.3.1. Estatística da Morfometria.....	86
3.3.4. Análise de Genotoxicidade – Ensaio Cometa.....	88
3.3.4.1. Maceramento em Solução de Fracionamento.....	88
3.3.4.2. Centrifugação do Material	88
3.3.4.3. Preparo das Lâminas Histológicas.....	88
3.3.4.4. Tratamento com Solução de Lise e Eletroforese	89
3.3.4.5. Tratamento com Solução Fixadora	89
3.3.4.6. Coloração Fluorescente - DAPI.....	89
3.3.4.7. Contagem de Nucleoides	90
3.3.4.8. Parâmetros Quantitativos.....	90
3.3.4.9. Estatística do Ensaio Cometa	91
3.3.5. Análise Histoquímica De Fluorescência	92
3.3.5.1. Preparo do Material e Emblocamento em Parafina	92
3.3.5.2. Técnica de Coloração Acridine Orange.....	92
3.3.6. Análises Histoquímicas	94
3.3.6.1. Preparo do Material e Emblocamento em Parafina	94
3.3.6.2. Técnica de Coloração Azul de Bromofenol.....	95
3.3.6.3. Técnica de Coloração Ácido Periódico de Schiff.....	95
3.3.6.4. Técnica de Coloração Sudan Black	96
3.4. RESULTADOS	98
3.4.1. Análise Morfológica.....	98
3.4.1.1. Trofócitos.....	98
3.4.1.2. Enócitos	99
3.4.1.3. Células Pericárdicas.....	100
3.4.2. Análise Morfométrica	103
3.4.2.1. Trofócitos.....	103
3.4.2.2. Enócitos	104
3.4.2.3. Células Pericárdicas.....	105
3.4.3. Análise Genotóxica.....	107
3.4.3.1. Classificação dos Níveis de Dano	107
3.4.3.2. Parâmetros Quantitativos.....	108

3.4.3.3. Análise Estatística - Ensaio Cometa	113
3.4.4. Análise Histoquímica de Fluorescência	114
3.4.4.1. Trofócitos.....	114
3.4.4.2. Enócitos	115
3.4.4.3. Células Pericárdicas.....	115
3.4.5. Análises Histoquímicas	117
3.4.5.1. PAS	117
3.4.5.1.1. Trofócitos	117
3.4.5.1.2. Enócitos.....	117
3.4.5.1.3. Células Pericárdicas	118
3.4.5.2. Azul de Bromofenol	120
3.4.5.2.1. Trofócitos	120
3.4.5.2.2. Enócitos.....	120
3.4.5.2.3. Células Pericárdicas	121
3.4.5.3. Sudan Black.....	123
3.4.5.3.1. Trofócitos	123
3.4.5.3.2. Enócitos.....	123
3.4.5.3.3. Células Pericárdicas	124
3.5. DISCUSSÃO	126
3.6. CONCLUSÃO	155
REFERÊNCIAS.....	156
4. CAPÍTULO FINAL.....	163
4.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	163
REFERÊNCIAS.....	165
APÊNDICES	181

1. INTRODUÇÃO

1.1. ABELHAS COMO BIOINDICADORAS DA QUALIDADE AMBIENTAL

Os insetos são o grupo de animais mais abundantes e amplamente distribuídos nos ecossistemas, e apresentam grande importância para a subsistência dos seres humanos. Há aproximadamente 400 milhões de anos os insetos tornaram-se o grupo biológico dominante do planeta, com cerca de 100 milhões de espécies desde seu surgimento. Atualmente o grupo biológico constitui 65% de toda a biodiversidade conhecida no planeta (Parikh; Rawtani; Khatri, 2021). O interesse pelo estudo desse táxon está relacionado com a importância de sua função ecológica, que envolve a manutenção de recursos naturais, gerenciamento da produtividade agrícola e profilaxia de doenças transmitidas aos seres humanos (Buchholz; Egerer, 2020). Em trabalhos científicos esses animais são utilizados em estudos de diversas áreas, como mudanças climáticas, biologia do desenvolvimento, ecologia, ecotoxicologia, evolução, genética e fisiologia (Morris, 2020).

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera, família Apidae com aproximadamente vinte mil espécies descritas. A família Apidae apresenta várias tribos como Apini, Bombini, Euglossini, Meliponini, Xylocopini, entre outros. A grande maioria das espécies apresenta hábitos solitários e cerca de mil espécies são sociais, com variados graus de sociabilidade. Os táxons com maiores graus de sociabilidade são encontrados em dois grupos: as abelhas altamente eussociais, como as tribos Apini e Meliponini; e as primitivamente eussociais, como a tribo Bombini, que inclui as abelhas do gênero *Bombus* (Abrol; Mondal; Shankar, 2021; Toledo-Hernández *et al.*, 2022).

Os impactos ambientais causados pela ação humana modificaram as condições ambientais dos ecossistemas. Diversos impactos ambientais de natureza antrópica contribuem atualmente para o declínio da biodiversidade no mundo todo. Entre esses fatores estão a utilização de agrotóxicos, substâncias relacionadas ao controle de pragas em sistemas agrícolas, mas também essencialmente prejudiciais para espécies de insetos polinizadores (Brasil *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2024). Os insetos apresentam sistemas sensoriais especializados, localizados principalmente na cabeça, responsáveis por capacitá-los a reconhecer e explorar diversos habitats. Esses órgãos são afetados pelos efeitos dos agrotóxicos (Carvalho *et al.*, 2024). Os efeitos toxicológicos sobre o organismo dos polinizadores contribuem para o entendimento e identificação de impactos ambientais (Chowdhury *et al.*, 2023) que de acordo com levantamentos bibliográficos,

podem resultar na extinção de 40% de todas as espécies de insetos do mundo nas próximas décadas (Sánchez-Bayo; Wyckhuys, 2019). O cenário, além de alarmante, contribui para que espécies de insetos possam ser utilizadas como ferramenta para monitorar a qualidade de ambientes contaminados por substâncias tóxicas. As atividades vitais dos polinizadores como metabolismo, crescimento e reprodução são afetados pelos agrotóxicos (Chowdhury *et al.*, 2023), de forma que muitas espécies de insetos possam ser utilizadas em estudos ecotoxicológicos como importantes bioindicadores da qualidade ambiental (Brasil *et al.*, 2020).

Os bioindicadores são organismos biológicos que podem ser utilizados para avaliar o estado qualitativo do meio ambiente, ou seja, são utilizados para mensuração da funcionalidade dos ecossistemas naturais e as alterações biogeográficas causadas pela ação antrópica (Khatri *et al.*, 2018; Di Fiore *et al.*, 2022). Eles indicam como a mudança ambiental afeta um habitat, comunidade ou ecossistema. Os bioindicadores também são importantes ferramentas para o fornecimento de informações sobre os compostos químicos encontrados no ambiente e os efeitos da intensidade da exposição sobre seus organismos (Chowdhury *et al.*, 2023). A utilização de insetos terrestres como bioindicadores é aplicada há décadas para o monitoramento da qualidade ambiental e inclui diversos grupos como abelhas, libélulas, besouros, mariposas, borboletas, moscas, formigas, entre outros (Parikh; Rawtani; Khatri, 2021).

As abelhas são importantes bioindicadores e organismos biológicos fundamentais para a manutenção da integridade dos ecossistemas e da biodiversidade. Durante a polinização, a interação desses animais com as flores e a capacidade de visitar extensas áreas possibilitam o contato com substâncias químicas presentes nos habitats (Sonika; Kumar, 2021; Di Fiore *et al.*, 2022). As abelhas podem, por consequência, consumir poluentes enquanto forrageiam, transportá-los para as colônias, fornecê-los para alimentação das larvas ou agregá-los aos materiais utilizados na construção de seus ninhos (Feldhaar; Otti, 2020). Dessa forma, o monitoramento de compostos químicos como agrotóxicos passa a ser uma ferramenta importante, não apenas para comprovar riscos potenciais sobre as populações de polinizadores, mas também para determinar o nível de contaminação ambiental em determinada região (Chowdhury *et al.*, 2023). Atualmente, técnicas de monitoramento, análises químicas e processamento de dados permitem caracterizar áreas afetadas por agrotóxicos, indicar os períodos de maior risco

de contaminação e identificar compostos mais tóxicos para as abelhas em culturas agrícolas (Di Fiore *et al.*, 2022).

Levantamentos realizados por Di Fiore *et al.* (2022) indicaram que as abelhas podem acumular poluentes ambientais em seu organismo e fornecer dados sobre a progressão da poluição ambiental ao longo do tempo e dos locais onde realizam forrageio. O quadro torna as espécies de abelhas importantes bioindicadores por apresentarem adequarem os elementos químicos encontrados nos habitats onde realizam o forrageio, com os encontrados em seu organismo (Chowdhury *et al.*, 2023). Pesquisas realizadas por Negri *et al.* (2015) revelaram que ao analisar as abelhas da espécie *Apis mellifera* expostas a metais-traço, foi demonstrado que poluentes químicos eram encontrados em partes dos corpos das abelhas relacionados com o transporte e manuseio do pólen, como ao longo de asas dianteiras, cabeça e a superfície interna das pernas traseiras. Pesquisa semelhante realizada por Pellecchia e Negri (2018) confirmou a importância de *A. mellifera* como bioindicador da poluição atmosférica ao forragearem a locais próximos a uma fábrica de cimento localizada em Lugagnano Val d'Arda, região da Emília-Romanha, Itália. As abelhas foram expostas a uma grande variedade de poluentes que permaneceram retidos em seus corpos, evidenciando a possibilidade de monitorar os locais e a concentração de metais traço daquela região.

1.2. SERVIÇOS ECOSISTÊMICOS E A POLINIZAÇÃO

Além de importantes bioindicadores da qualidade ambiental, espécies de abelhas são os principais polinizadores do planeta, serviço ecossistêmico fundamental para garantir a reprodução sexuada das plantas e a segurança alimentar humana. Os serviços ecossistemas são os benefícios que os seres humanos recebem mediante as atividades desenvolvidas pelos demais seres vivos nos ecossistemas, sem as quais não poderia existir vida no planeta. Os serviços ecossistêmicos são estruturados na forma de bens e serviços, ou seja, os componentes dos ecossistemas e as atividades efetuadas pelos organismos biológicos, respectivamente (Voumik; Mimi; Raihan, 2023).

Os serviços ecossistêmicos são encontrados de diversas formas, como funções de regulação (gases, clima, regulação da água, retenção do solo, suprimento de água, formação do solo, polinização, controle biológico); funções de habitat (local de vida adequado, habitat de reprodução adequado); funções de produção (alimentos, matérias-

primas, recursos genéticos); e funções culturais (estética, recreação espiritual, ciência e educação) (Kaya; Gültekin; Gültekin, 2023) (Fig. 1).

Figura 1 - Serviços Ecossistêmicos



Figura 1 – Serviços Ecossistêmicos. Fonte: Serviços Ecossistêmicos. Disponível em: <<https://etica-ambiental.com.br/o-que-sao-servicos-ecossistemicos/>>. Acesso em: 02/10/2023.

Os serviços ecossistêmicos efetuados pelos insetos, além de contribuir para garantir a estrutura trófica das cadeias alimentares (Kaya; Gültekin; Gültekin, 2023), também estão relacionados com a ciclagem de nutrientes, dispersão de sementes, manutenção da fertilidade do solo e, principalmente, a polinização de diversas espécies vegetais (Stephens *et al.*, 2023). Essas características tornam os insetos dentre os grupos de animais mais importantes para manutenção da funcionalidade dos ecossistemas no planeta (Scaccabarozzi *et al.*, 2024). A polinização é fundamental para manutenção da funcionalidade dos ecossistemas e para garantia da segurança alimentar dos seres humanos e outros animais (Khalifa *et al.*, 2021).

A polinização é um processo essencial para estabelecer a reprodução sexuada do grupo das angiospermas. Oitenta e sete por cento de todas as espécies de angiospermas são dependentes da polinização para reprodução, principalmente efetuada pelos insetos

(Catania *et al.*, 2023). O processo é fundamental para garantia da recombinação gênica e para o estabelecimento do aumento da variabilidade genética de populações das espécies vegetais (Toselli; Sgolastra, 2020). De forma incontestável, a manutenção da variabilidade genética dentro de populações é imprescindível para proporcionar resistência frente à pressão da seleção natural imposta por mudanças ambientais (Pardo; Borges, 2020; Stephens *et al.*, 2023).

Os polinizadores são animais como os insetos (abelhas, moscas, vespas, mariposas, borboletas e besouros) e vertebrados (pássaros, morcegos, lagartos e pequenos mamíferos), de forma que as espécies de abelhas são as principais polinizadoras nos ecossistemas (Stephens *et al.*, 2023). Como as espécies de plantas e seus polinizadores coevoluíram ao longo de milhares de anos, existe uma interação mutualística, em que os polinizadores recebem alguma forma de “recompensa” nutricional pela visita e entrega de pólen (Kaya; Gültekin; Gültekin, 2023). A maneira mais comum como as plantas atraem os polinizadores é fornecendo alimentos como grãos de pólen, estruturas com os gametas masculinos presentes nas anteras das flores. O grão de pólen adere ao corpo dos polinizadores que, ao visitarem outras plantas, realizam o transporte de pólen para as partes femininas das flores, o pistilo. Os polinizadores apresentam características comportamentais e anatômicas que aumentam a eficiência e a precisão da entrega de pólen (Sukumaran; Khanduri; Sharma, 2020; Khalifa *et al.*, 2021). O pólen também é utilizado como a principal fonte de proteínas para as larvas dentro das colônias (Timerman; Barrett, 2021). As plantas também podem oferecer néctar, óleos, resinas, fragrâncias e outros recursos que induzem a visita de abelhas para entrega do pólen (Ballarin, 2024).

Espécies de abelhas realizam a polinização de plantas silvestres e de sistemas agrícolas. Na agricultura, os polinizadores promovem o aumento quantitativo e qualitativo de sementes e frutos, contribuem para plantas mais resistentes e influenciam no controle de pragas (Pardo; Borges, 2020). Culturas como trigo, milho, arroz, algodão, além de óleos, bebidas alcoólicas e medicamentos são produzidos a partir de plantas polinizadas por insetos (Abrol; Mondal; Shankar, 2021; Khalifa *et al.*, 2021). As espécies de abelhas protagonizam a polinização de uma variedade de culturas essenciais para alimentação humana, como maçã, frutas cítricas, tomate, melão, morango, pêssego, cereja, manga, uva, azeitona, cenoura, batata, cebola, abóbora, feijão, pepino, girassol, nozes, alfafa, cacau, kiwi, maracujá, melancia, dentre outros (Abrol; Mondal; Shankar,

2021). Portanto, em casos de declínio de populações de polinizadores, a produção global de alimentos e a segurança alimentar humana serão afetados de forma inevitável (Katumo *et al.*, 2022).

Estima-se que cerca de 75% de toda produção agrícola mundial dependa da polinização realizada por animais, de forma que somente as culturas dependentes da polinização efetuada por espécies de insetos apresente um valor anual que varia entre US\$ 195 bilhões a US\$ 387 bilhões (Catania *et al.*, 2023). Somente nos EUA, a polinização resulta em US\$ 16 bilhões ao ano, de forma que US\$ 12 bilhões são vinculados exclusivamente por espécies de abelhas (Rader *et al.*, 2016). No entanto, estimar o valor da polinização em ecossistemas naturais e prever as consequências de sua perda são mais desafiantes do que estimar seu valor econômico na agricultura (Kaya; Gültekin; Gültekin, 2023). Nos ecossistemas naturais, a polinização insuficiente resulta em consequências graves relacionadas com a manutenção da diversidade biológica, como a extinção local de espécies (Abrol; Mondal; Shankar, 2021).

1.3. AÇÃO ANTRÓPICA SOBRE OS SERVIÇOS ECOSSISTÊMICOS

A dinâmica de um ecossistema autossuficiente influencia o fornecimento de recursos naturais dos quais os seres vivos se beneficiam. A crescente transformação de ambientes naturais para uso de recursos naturais prejudicou este cenário. Atividades antrópicas, como uso inadequado do solo, emissão de poluentes e desmatamento afetam a manutenção de processos fundamentais para sustentar a vida na Terra (Sannigrahi *et al.*, 2020). Os impactos ambientais causados pela ação humana interagem de forma simultânea e vincular funções ecológicas é fundamental para o gerenciamento holístico de serviços ecossistêmicos (Ekka *et al.*, 2020). Neste contexto, as atividades humanas exploram de forma multifuncional os ecossistemas naturais. Estima-se que entre os anos de 1700 e 2000, o crescimento de atividades agrícolas reduziu a extensão da vegetação do planeta, causando extinções em massa. A extinção local de uma espécie biológica é acompanhada pela perda de suas interações com outros seres vivos e o ambiente natural, de forma que funções ecológicas são perdidas. Estas interações podem ser críticas para a sobrevivência de outras espécies ou da funcionalidade do ecossistema. Atualmente, a exploração de recursos naturais acompanha o desafio de garantir o uso e gerenciamento sustentáveis desses recursos para atender demandas de mercado e o crescimento econômico (Sannigrahi *et al.*, 2020; Prakash; Verma, 2022).

As principais ameaças à biodiversidade e a prestação de serviços ecossistêmicos causados pela ação antrópica são a perda de habitat, o desmatamento, introdução de espécies exóticas e poluição (Prakash, 2021). A perda de habitats, mudanças climáticas e a poluição são reconhecidos como os principais agentes que contribuem para perda da biodiversidade e de serviços ecossistêmicos (Sannigrahi *et al.*, 2020; Prakash; Verma, 2022), interferindo em processos ecológicos envolvendo polinização, manutenção da fertilidade do solo, biociclos da água, do carbono, entre outros processos (Prakash; Verma, 2022).

As espécies exóticas invasoras se estabeleceram fora de sua área natural, geralmente introduzidas pela ação humana, podem causar extinções de espécies nativas e tornarem-se pragas (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). As espécies invasoras podem parasitar ou preda espécies nativas, hibridizar, competir por recursos, introduzir doenças e modificar habitats. Geralmente as espécies exóticas se adaptam aos novos ecossistemas, apresentam acentuado crescimento populacional, redefinem processos ecológicos no novo ambiente, e ameaçam a biodiversidade local (Prakash, 2017; Prakash; Verma, 2022).

A perda de habitats está relacionada com o crescimento demográfico e as crescentes demandas por recursos naturais. O ambiente natural passa então a ser utilizado para práticas agrícolas, mineração, infraestrutura industrial e áreas urbanas, resultando em perda de biodiversidade. A exploração de recursos naturais como é praticada atualmente também está relacionada com o crescimento populacional e a perda de habitats. Os avanços científicos e tecnológicos possibilitaram a maximização da capacidade exploratória dos recursos naturais de forma insustentável, agravando ainda mais a situação (Sannigrahi *et al.*, 2020; Prakash; Verma, 2022). Alguns estudos indicam que dentro de 200 ou 300 anos, cerca de 50% de todas as espécies de mamíferos e pássaros possam extinguir (Prakash; Verma, 2022). A produção de alimentos, a formação do solo, a regulação do clima e de gases atmosféricos estão relacionados com a abundância e funcionalidade dos ecossistemas (Arowolo *et al.*, 2018). O desmatamento é outra forma de perda de habitats e estima-se que aproximadamente metade das florestas tropicais do início do século XX já desapareceram (Prakash; Verma, 2022).

A poluição é outro efeito das atividades antrópicas que prejudica os serviços ecossistêmicos. As atividades agrícolas liberam substâncias químicas como fertilizantes e agrotóxicos no meio ambiente, que podem causar impactos ambientais (Masih, 2021). A poluição por agroquímicos foi identificada como um dos principais fatores associados

ao declínio generalizado de espécies de insetos, incluindo abelhas e outros polinizadores (Sgolastra *et al.*, 2020). A sensibilidade de espécies à exposição a agrotóxicos é variada, mas conhecida por prejudicar as relações ecológicas nas cadeias alimentares e os serviços ecossistêmicos (Prakash; Verma, 2022).

As mudanças climáticas são alterações do clima ao longo do tempo, causadas de forma natural ou acentuadas pelas atividades humanas (Verma, 2021). As mudanças climáticas podem impactar os padrões comportamentais em diversas espécies e prejudicar suas funções ecológicas (Schäfer *et al.*, 2018). As causas são atribuídas principalmente pela liberação de gases de efeito estufa para atmosfera, resultantes principalmente pela queima de combustíveis fósseis (Prakash, 2021). À medida que as temperaturas aumentam, as espécies tendem a migrar para latitudes e altitudes mais elevadas, pois ao alterar os padrões de temperatura e chuva, espécies são forçadas a migrarem para regiões com condições mais favoráveis. Assim, alterações no clima causam modificações nas paisagens, de forma que algumas espécies não consigam se adaptar mais às novas condições. No sul da Ásia, cada aumento de 1°C acima do limite de 26 °C causa prejuízos em 10% na produção de arroz por impactar a polinização realizada principalmente por espécies de abelhas nativas (Sannigrahi *et al.*, 2020). O aquecimento global também está relacionado com a elevação dos níveis dos oceanos, resultando em reduções de áreas litorâneas e de ilhas, contribuindo mais uma vez para perda de biodiversidade (Prakash, 2021; Prakash; Verma, 2022).

O declínio de populações de espécies de abelhas nativas é conhecido e recebe grande atenção por parte da comunidade científica (Sanchez-Bayo; Wyckhuys, 2019). O desenvolvimento econômico sem a adoção de estratégias sustentáveis representa riscos à diversidade e abundância desses animais. Os impactos ambientais podem reduzir a quantidade e qualidade dos recursos florais e habitats de nidificação das espécies de abelhas, assim como prejudicar a aptidão destes animais (Hanberry *et al.*, 2021), ocasionando perda da biodiversidade nos ecossistemas naturais (Reverte *et al.*, 2020). Aproximadamente 60% dos serviços ecossistêmicos globais são impactados por atividades antrópicas devido a atividades insustentáveis (Xu *et al.*, 2018). Nesse contexto, políticas de proteção ambientais são necessárias para mitigar os impactos causados pela ação antrópica sobre os serviços ecossistêmicos (Reverte *et al.*, 2020).

A polinização realizada por espécies de abelhas é severamente impactada pelas atividades antrópicas. Como tentativa para sensibilizar a opinião pública, a atribuição de

valores econômicos aos serviços ecossistêmicos de polinização representa uma ferramenta importante na tentativa de preservar esses animais. No entanto, não é possível quantificar o valor ecológico da polinização (Ekka *et al.*, 2020). Com relação ao panorama observado, o trabalho atual apresenta resultados e levanta argumentos na tentativa de proteção da biodiversidade de espécies de abelhas nativas e de serviços ecossistêmicos.

1.4. CONSERVAÇÃO DAS ABELHAS NATIVAS

À medida que ocorre o declínio populacional de espécies de abelhas, torna-se fundamental o planejamento de medidas para reverter ou minimizar os efeitos antrópicos prejudiciais aos ecossistemas e populações de polinizadores. A presença de abelhas nativas contribui para a biodiversidade nos ecossistemas e promove aumento da produção agrícola (Kaya; Gültekin; Gültekin, 2023). Os polinizadores sustentam a produtividade de muitas culturas, muitas vezes sem a consciência dos agricultores. No entanto, a adoção de práticas sustentáveis no setor agrícola permanece baixa, principalmente devido à falta de conhecimento sobre o manejo de atividades sustentáveis (Scheper *et al.*, 2023).

A importância da conservação de espécies de abelhas é defendida por pesquisadores. No entanto, setores da sociedade continuam mal informados em todo mundo e negligenciam as consequências relacionadas aos desastres ambientais e problemas sociais associados com o declínio de espécies de abelhas nativas. A conscientização sobre a importância desses polinizadores necessita sensibilizar principalmente os profissionais do agronegócio e com poder de implementar políticas públicas para promover medidas mitigatórias de impactos ambientais para conservação desses animais (Kaya; Gültekin; Gültekin, 2023). Esses esforços envolvem educação ambiental e as ações devem ser focadas em atividades para minimizar as causas do declínio populacional de polinizadores, como a racionalização do uso de agrotóxicos, ou seja, a utilização deve ocorrer como última estratégia e somente quando muito necessária. Em alguns casos a proibição de determinados compostos químicos deve ser concretizada (Di Fiore *et al.*, 2022). Além dos valores econômicos e ecológicos, a conservação das abelhas nativas garante a manutenção e melhoria de outros aspectos importantes para os seres humanos, como estética paisagística para atividades recreativas e culturais. Em vista do que foi abordado, há a necessidade de identificar as espécies de abelhas nativas em declínio populacional, analisar as causas locais, para elaborar estratégias de

monitoramento e iniciativas para conservação desses animais (Abrol; Mondal; Shankar, 2021).

2. CAPÍTULO 1 – AS ABELHAS DO GÊNERO *BOMBUS* EM PESQUISAS ECOTOXICOLÓGICAS

RESUMO

As abelhas nativas do gênero *Bombus* são fundamentais para polinização das plantas nos biomas nacionais. No entanto, atualmente observa-se redução na distribuição e abundância dessas abelhas, causado principalmente devido à utilização de agrotóxicos em sistemas agrícolas, como o fipronil. Para classificar a toxicidade de agrotóxicos, formulações comerciais fornecem as Avaliações de Risco. No entanto, muitas vezes os efeitos subletais dos agrotóxicos sobre espécies de abelhas nativas são negligenciados nas Avaliações de Risco. A espécie *B. atratus* foi utilizada na atual pesquisa por ser encontrada nas regiões sul e sudeste do país, local onde a pesquisa foi realizada. O atual trabalho avaliou o efeito das concentrações subletais de fipronil encontradas na natureza sobre as células do sistema hepatonefrítico (SHN), fundamental para a sobrevivência dos insetos. O SHN é a primeira barreira para neutralização de compostos químicos presentes no organismo dos insetos, formado principalmente por trofócitos, enócitos e células pericárdicas, que formam um sistema concêntrico em torno do vaso dorsal dos insetos. A atual pesquisa analisou os efeitos das concentrações subletais de fipronil encontradas em campo e utilizadas na pulverização de culturas agrícolas, $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$. A pesquisa considerou que essas concentrações fossem capazes de prejudicar o organismo de espécies de abelhas nativas. Assim, o atual trabalho realizou um levantamento da problemática da utilização dos agrotóxicos de forma inadequada e não racionalizada em sistemas agrícolas e a forma como essas substâncias podem prejudicar o organismo de espécies de abelhas nativas, como *B. atratus*.

Palavras-chave: biomarcadores; mamangavas; pesticidas; pulverizações.

ABSTRACT

Native bees of the genus *Bombus* are essential for plant pollination in Brazil's biomes. However, there is currently a decline in the distribution and abundance of these bees, primarily due to the use of pesticides, such as fipronil, in agricultural systems. Commercial formulations provide Risk Assessments to classify pesticide toxicity. However, the sublethal effects of pesticides on native bee species are often overlooked in Risk Assessments. The species *B. atratus* was used in the current research because it is found in the southern and southeastern regions of the country, where the research was conducted. The current study evaluated the effect of sublethal concentrations of fipronil found in nature on cells of the hepatonephritic system (HNS), which is essential for insect survival. The HNS is the first barrier to neutralizing chemical compounds present in insect organisms, composed primarily of trophocytes, oenocytes, and pericardial cells, which form a concentric system around the insects' dorsal vessel. The current study analyzed the effects of sublethal concentrations of fipronil found in the field and used in crop spraying: $1.5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2.5 \mu\text{L L}^{-1}$, and $3.5 \mu\text{L L}^{-1}$. The study found that these concentrations could harm native bee species. Therefore, the current study surveyed the problem of inappropriate and irrational pesticide use in agricultural systems and how these substances can harm native bee species, such as *B. atratus*.

Keywords: biomarkers, bumblebees, pesticides, spraying.

2.1. INTRODUÇÃO

As abelhas são importantes bioindicadores e imprescindíveis para manutenção da biodiversidade nos ecossistemas (Sonika; Kumar, 2021). No entanto, a utilização extensiva de agrotóxicos representa uma grande ameaça para as abelhas nativas e o monitoramento desses compostos químicos é fundamental para comprovar os riscos sobre as populações de polinizadores (Chowdhury *et al.*, 2023). Dessa forma, o atual trabalho será realizado para demonstrar o potencial que concentrações subletais de agrotóxicos utilizados em sistemas agrícolas nacionais apresentam para prejudicar os polinizadores de forma individual, mesmo sendo organismos não-alvos da ação dos agrotóxicos (Sgolastra *et al.*, 2020).

A polinização realizada pelas abelhas nativas do gênero *Bombus* é fundamental para garantir a diversidade de espécies vegetais e a variabilidade genética das plantas (Catania *et al.*, 2023). As abelhas do gênero *Bombus* exploram uma grande diversidade de habitats e são fundamentais para polinização das angiospermas nos ecossistemas (Catania *et al.*, 2023). Embora grande parte da diversidade de espécies das abelhas do gênero *Bombus* esteja localizada no continente europeu, também existem representantes nas Américas (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). No entanto, o declínio populacional desses polinizadores é relatado em diversos estudos. As causas do declínio populacional são multifatoriais e atribuída principalmente à utilização de agrotóxicos (Chowdhury *et al.*, 2023; Kaya; Gültekin; Gültekin, 2023). Nesse contexto, o Brasil está entre os três países que mais utilizam agrotóxicos em sistemas agrícolas (Perobelli, 2025), o que intensifica a exposição das abelhas nativas (Bálsamo *et al.*, 2020). Assim, torna-se imprescindível minimizar os efeitos antrópicos prejudiciais aos ecossistemas (Kaya; Gültekin; Gültekin, 2023). O objetivo do trabalho é buscar a conservação e proteção das espécies de abelhas nativas do gênero *Bombus*, indispensáveis para manutenção do serviço ecossistêmico da polinização dos biomas nacionais.

Os esforços para garantir a proteção das abelhas do gênero *Bombus* são negligenciados, ou recebem pouca atenção, apesar da importância ecológica que essas abelhas apresentam. Grande parte das pesquisas ecotoxicológicas sobre os efeitos de concentrações subletais de agrotóxicos em abelhas são realizadas com a espécie *A. mellifera*, que não apresenta a mesma sensibilidade comparação com espécies do gênero *Bombus* (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). Portanto, existe um escasso conhecimento sobre os efeitos subletais de agrotóxicos sobre espécies de abelhas nativas em comparação

com *A. mellifera*. A falta de informações prejudica a construção de legislações para proteção dessas abelhas (Ellman *et al.*, 2023). O fipronil foi um agrotóxico utilizado em larga escala no Brasil e com poucas informações sobre seus efeitos toxicológicos sobre espécies de abelhas nativas (Pisa *et al.*, 2021). Dessa forma, a atual pesquisa analisará os efeitos subletais do fipronil sobre abelhas nativas da espécie *B. atratus*. A contaminação das abelhas nativas pelo fipronil ocorre principalmente pela pulverização de culturas agrícolas (Carvalho *et al.*, 2024). O fipronil é um inseticida com ação inibitória de receptores pós-sinápticos neuronais, causando estimulação excessiva dos neurônios (Farder-Gomes, 2021) e prejudicando habilidades cognitivas dos insetos (Riveros; Gronenberg, 2022).

Para avaliar a toxicidade de agrotóxicos, as Avaliações de Risco são realizadas e encontradas nas formulações comerciais. No entanto, grande parte das Avaliações de Risco das formulações comerciais não fornecem informações sobre os efeitos subletais dos agrotóxicos e negligenciam os efeitos causados sobre espécies de abelhas nativas. De forma majoritária, as Avaliações de Risco sobre os efeitos de agrotóxicos em abelhas utilizam *A. mellifera* em suas análises e poucas informações são fornecidas sobre espécies de abelhas nativas, como as do gênero *Bombus* (Carvalho *et al.*, 2024). Dessa maneira, a atual pesquisa poderá contribuir com informações importantes sobre efeitos subletais do fipronil sobre as abelhas nativas do gênero *Bombus*.

Para analisar os efeitos subletais de substâncias químicas sobre o organismo de insetos, faz-se necessário a utilização de biomarcadores de efeito, definidos como alterações bioquímica, morfológica, histológica, fisiológica e comportamental de espécies biológicas (NRC, 1987; Nicewicz *et al.*, 2021). Assim, o atual trabalho utilizará biomarcadores para avaliar o efeito do fipronil sobre células de um sistema crucial para a sobrevivência dos insetos, conhecido como sistema hepatonefrítico (SHN) e descrito inicialmente por Abdalla e Domingues (2015). O SHN é uma combinação de tecidos formados principalmente pelo corpo gorduroso (trofócitos e enócitos) e pelas células pericárdicas (Abdalla; Domingues, 2015). A importância do estudo das células do SHN de *B. atratus* expostas a agrotóxicos está relacionado com a função desse sistema-chave para o organismo dos insetos. O SHN representa a primeira linha de barreira para neutralização de substâncias tóxicas no organismo dos insetos (Abdalla; Domingues, 2015). Nesse contexto, caso as células do SHN sejam afetadas pela ação do fipronil, é possível comprovar que as concentrações subletais de fipronil encontradas na natureza

apresentam capacidade para prejudicar as abelhas nativas do gênero *Bombus*. O atual trabalho buscará levantar informações sobre os efeitos subletais do fipronil para as abelhas do gênero *Bombus*, na tentativa de contribuir para o melhor entendimento dos efeitos toxicológicos desse agrotóxico sobre as abelhas nativas.

2.2. REVISÃO DA LITERATURA

2.2.1. Biologia Geral das Abelhas do Gênero *Bombus*

O gênero *Bombus* compreende o clado monofilético Bombini que, em conjunto com Apini (abelhas do mel), Meliponini (abelhas sem ferrão), e Euglossini (abelhas das orquídeas), constituem as abelhas corbiculadas, que se identificam pela estrutura transportadora de pólen na perna traseira. Atualmente são reconhecidas cerca de 270 espécies de *Bombus*, com 38 subgêneros (Taye; Rahman; Borkataki, 2020; Ghisbain, 2021). As abelhas do gênero *Bombus* são robustas, podem apresentar muitas cores e exploram uma grande diversidade de habitats. A maior diversidade de espécies é encontrada na Europa e América do Norte, com representantes também no continente americano. A adaptação dessas abelhas em extensa variedade de climas e habitats é explicada pela sua eficiência de forrageio. Os indivíduos adultos se alimentam principalmente de néctar, fornecendo energia para o voo, enquanto as larvas são alimentadas com grãos de pólen e mel, que fornecem nutrientes para o crescimento (Abrol; Mondal; Shankar, 2021).

As abelhas do gênero *Bombus* realizam polinização por vibração ao apoiarem-se nos estames das flores, vibrando os músculos do tórax e fazendo com que o grão de pólen seja liberado (Xu *et al.*, 2025). Elas podem marcar as flores polinizadas por meio de feromônios, que as impede de visitar a mesma flor novamente (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). Essas abelhas são capazes de realizar polinização de até 8 km do entorno da colônia, visitar grande número de flores, suportar grande quantidade de pólen e forragear em climas adversos e por longos períodos de tempo (Crowther *et al.*, 2019).

As abelhas do gênero *Bombus* são encontradas geralmente em regiões de clima temperado, embora algumas espécies sejam encontradas em regiões tropicais (Maebe *et al.*, 2021). Elas podem apresentar atividade de forrageio em condições climáticas adversas, como em temperaturas de até -3,6°C e em condições com vento e chuva. Essas abelhas são polinizadoras mais eficientes por volta do meio-dia e em temperaturas entre

15 a 25°C. Em dias quentes, acima de 25°C, elas forrageiam pela manhã e no final da tarde. Geralmente não é observado forrageio em temperaturas acima de 35°C (Descamps *et al.*, 2021; Russell; Mcfrederick, 2022). Essas características tornam as abelhas do gênero *Bombus* polinizadoras de grande eficiência, de forma a realizar polinização seletiva de certas espécies vegetais (Abrol; Mondal; Shankar, 2021).

O Brasil apresenta seis espécies do gênero: *B. morio* (Swederus, 1787), *B. atratus* (Franklin, 1913), *B. bellicosus* (Smith, 1879), *B. brasiliensis* (Lepeletier, 1836), *B. brevivillus* (Franklin, 1913) e *B. transversalis* (Olivier, 1789). A espécie *B. atratus* foi utilizada para atual pesquisa por serem encontradas nas regiões sul e sudeste do país em campos e cerrado moderadamente secos, e assim é possível a coleta no local em que a pesquisa foi realizada (Krechemer; Marchioro; Butt, 2020; Oliveira *et al.*, 2022).

2.2.2. Organização Social Do Gênero *Bombus*

Os diversos modos de vida observados entre as espécies de abelhas são denominados graus de sociabilidade. As abelhas são classificadas de acordo com o grau de sua organização social, como as espécies solitárias e sociais (Catania *et al.*, 2023). A maioria das espécies de abelhas apresenta modo de vida solitário, com fêmeas construindo e abastecendo os ninhos, sem cooperação com outros indivíduos (Polidori; Ferrari; Ronchetti, 2025). Em algumas espécies de abelhas solitárias não ocorrem cuidados parentais, de forma que após a oviposição, a fêmea não retorna ao ninho ou morre antes das eclosões. Além das espécies solitárias, existem também as abelhas parasitas, como as cleptoparasitas, que depositam seus ovos nos ninhos de outras espécies; e espécies sociais (Catania *et al.*, 2023). Dentre estas, existe um sistema de casta, com diferenciação morfológica, fisiológica e comportamental, composto pela rainha e operárias, em que ocorre divisões de tarefas nas colônias. Na colônia existe um elevado grau de parentesco entre os indivíduos, pois as fêmeas são monogâmicas. A rainha é a responsável pela oviposição, enquanto por evitar que operárias ovipositem por meio de agressões físicas, impondo seu domínio dentro da colônia. As operárias executam praticamente todas as funções essenciais para a manutenção da colônia. De acordo com a idade e aptidão morfofisiológica, as operárias desempenham diferentes tarefas (Polidori; Ferrari; Ronchetti, 2025).

As abelhas operárias do gênero *Bombus* apresentam variação de tamanho de oito a dez vezes de massa corporal. O tamanho das abelhas determina a classificação de castas. A variação de castas entre as abelhas inicia-se ainda na fase larval e é determinada mediante a quantidade e qualidade de alimento ofertado às larvas (Cueva Del Castillo *et al.*, 2024). Em *Apis mellifera* o alimento é constituído de uma mistura de secreções das glândulas salivares e mandibulares, pólen e néctar que é regurgitada às larvas. Nas abelhas do gênero *Bombus*, a posição do alvéolo na área de cria (alvéolos periféricos ou centrais) influencia a quantidade de alimento que as larvas receberão. Larvas localizadas em alvéolos centrais geralmente recebem mais alimento em relação aos alvéolos periféricos. Em *A. mellifera*, operárias são inférteis e morfofisiologicamente diferentes da rainha (Martelli *et al.*, 2022). Em *Bombus*, de forma contrária, a rainha costuma ser apenas o indivíduo maior e dominante da colônia e as operárias são capazes de se acasalar. Entretanto, a rainha exerce forte dominância sobre as operárias por meio de agressões físicas, impedindo as operárias de acasalar. Esse sistema de organização social é classificado como eussocial primitivo (Princen *et al.*, 2020). Em *A. mellifera* a rainha exerce a dominância sobre as operárias por meio de feromônios (Margarita *et al.*, 2020).

As operárias mais robustas das abelhas *Bombus* tendem a servir como forrageiras por conseguirem transportar grandes quantidades de néctar e pólen para colônia. Operárias menores realizam tarefas relacionadas ao desenvolvimento das larvas e dificilmente tornam-se forrageiras (Mackenzie *et al.*, 2021). Os machos são haploides e gerados por partenogênese das operárias ou rainha não fecundada, enquanto as fêmeas são rainhas ou operárias, diploides, geradas por oviposição de uma rainha fecundada. A rainha é a fundadora do ninho, apresentando tamanho corporal maior que as operárias e responsável por manter a hierarquia e o controle das funções dentro da colônia (Martinet *et al.*, 2022). Caso a rainha desapareça, ocorre uma substituição por outra abelha forrageira maior e dominante, a falsa rainha, que por não ser fecundada, gera uma prole constituída de machos, mantendo a colônia em desenvolvimento até a fase reprodutiva. Caso a falsa rainha se acasale, são gerados novas rainhas e operárias (Princen *et al.*, 2020; Martinet *et al.*, 2022).

2.2.3. Ciclo das Colônias de *Bombus*

Os ninhos das abelhas do gênero *Bombus* geralmente são construídos em cavidades do solo e cobertos com uma camada de cera ou detritos de plantas. Um novo ninho é sempre iniciado por uma única rainha fecundada (fase solitária da colônia) (Martinet *et al.*, 2022). Após selecionar um local para a construção do ninho, a rainha constrói alguns potes de cera para armazenar pólen, mel e alvéolos para oviposição. Assim que as operárias emergem, a rainha abandona as atividades de campo, que passam a ser exercida pelas operárias (Mackenzie *et al.*, 2021).

Conforme a população aumenta dentro da colônia, a rainha perde sua dominância, levando ao aparecimento de operárias com ovários desenvolvidos, as quais também iniciam a construção de alvéolos para oviposição. Nesse estágio, a colônia atinge seu clímax de desenvolvimento, apresentando muitas fêmeas com ovários desenvolvidos e com potencial para reprodução (Mullins; Strange; Tripodi 2020; Mackenzie *et al.*, 2021). Durante algum tempo a rainha mantém sua dominância, comportando-se de maneira hostil e agredindo as operárias. Este comportamento não impede a oviposição de ovos haploides pelas operárias e aumento do crescimento populacional na colônia (Princen *et al.*, 2020). As agressões entre rainha e operárias tornam-se frequentes, até o ponto em que a rainha não consegue mais manter a dominância para evitar as oviposições das operárias. Os machos emergem antes das fêmeas e não retornam para colônia. As rainhas virgens abandonam a colônia para acasalar e estabelecer seus próprios ninhos, enquanto a antiga rainha é morta pelas operárias. Esse ciclo biológico ocorre em torno de seis meses e as colônias chegam a apresentar 500 a 600 operárias. Geralmente uma operária vive cerca de 4 semanas (Belsky *et al.*, 2020; Mullins; Strange; Tripodi 2020; Mackenzie *et al.*, 2021).

2.2.4. Importância Econômica e Ecológica de Abelhas do Gênero *Bombus*

Espécies de abelhas nativas são responsáveis pela manutenção da diversidade e abundância de muitas espécies vegetais no ambiente natural e regiões urbanas. As abelhas do gênero *Bombus* são fundamentais para manutenção da variabilidade genética e da biodiversidade de plantas dos biomas brasileiros, reconhecidamente fragilizados (Catania *et al.*, 2023). Por serem nativas, essas abelhas são polinizadoras mais eficientes em comparação com espécies exóticas como *A. mellifera*. Por apresentarem coevolução com as plantas nativas, as abelhas do gênero *Bombus* desempenham uma função ecológica

primordial para assegurar a polinização e a funcionalidade dos ecossistemas brasileiros (Scaccabarozzi *et al.*, 2024). No entanto, as abelhas do gênero *Bombus* não produzem mel em quantidade suficiente para comercialização, o que desperta menor atenção dos apicultores e prejudica os esforços para sua conservação (Abrol; Mondal; Shankar, 2021).

Em relação à importância econômica, as abelhas do gênero *Bombus* são polinizadores duas a quatro vezes mais eficazes em relação a *Apis mellifera* (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). Incorporar essas abelhas em produções agrícolas resulta em aumentos de produção, com diminuição de custos com insumos agrícolas, como fertilizantes e agrotóxicos (Macinnis; Forrest, 2020; Salvarrey *et al.*, 2020). A polinização realizada pelas abelhas do gênero *Bombus* em sistemas agrícolas resulta em melhoria da qualidade e quantidade dos frutos (Fijen *et al.*, 2018), aumentando o número e tamanho de frutos por planta (Hristov *et al.*, 2020). Em média, observa-se aumento de 14% do peso e 7% do tamanho dos frutos (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). Também é possível observar aumento da quantidade de pólen e sementes produzidos pelas plantas (Yankit *et al.*, 2018).

Pelo menos 25 das principais culturas produzidas em países europeus são polinizadas por essas abelhas, como kiwi, tomate, pimentão, morango, framboesa, mirtilo, abóbora, melão, pepino, entre outros (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). O valor anual estimado pela polinização realizado por abelhas do gênero *Bombus* em culturas agrícolas varia entre dois a três bilhões de dólares (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). Países como Holanda, Nova Zelândia, Espanha, Itália, Israel, França, Japão, Coreia do Sul, Alemanha, Canadá, Suécia, Brasil, Reino Unido e EUA já realizaram o manejo de abelhas do gênero *Bombus* em seus cultivos (Martin, *et al.*, 2019; Abrol; Mondal; Shankar, 2021). Na América do Norte, a espécie *Bombus impatiens* é utilizada para polinização de mirtilo, abóbora e pimentão (Belsky; Camp; Lehmann, 2020). Em outras regiões, cinco espécies são bem documentadas para o manejo de culturas agrícolas: *B. terrestris* (Europa, Norte da África, Ásia e Austrália), *B. occidentalis* (oeste da América do Norte), *B. ignitus* e *B. lucorum* (leste Asiático) e *B. impatiens* (América do Norte) (Liczner, 2020; Abrol; Mondal; Shankar, 2021).

2.2.5. Declínio de Populações de Abelhas Nativas

O declínio populacional de espécies de abelhas é estimado em aproximadamente 9% em todo o mundo e 37% na Europa. A proteção dos polinizadores tornou-se prioridade na agenda de política públicas em muitos países, que passaram a adotar medidas mitigatórias para amenizar a situação (Sgolastra *et al.*, 2020). O declínio de populações de abelha do gênero *Bombus* é relatado atualmente em pesquisas realizadas principalmente na Europa, América do Norte e América do Sul. As pesquisas ao longo da última década indicaram que reduções na distribuição e abundância de espécies destas abelhas são frequentes e que as causas são multifatoriais (Cameron; Sadd, 2020). Atualmente, a maior parte das pesquisas com as abelhas do gênero *Bombus* foram realizadas principalmente com as espécies *B. terrestris*, *B. impatiens* e *B. terricola*. Esses trabalhos são imprescindíveis para a compreensão da ação e a maneira como essas abelhas são afetadas por diferentes classes substâncias químicas, bem como para a formulação de estratégias para garantir a manutenção da diversidade e proteção destes polinizadores (Cameron; Sadd, 2020; Abrol; Mondal; Shankar, 2021). Assim, os estudos realizados com essas abelhas poderão ser utilizados para futuras tentativas de formulações de políticas governamentais para garantir a preservação desses animais.

Estudos apontam que o declínio local de populações das abelhas *Bombus* esteja associado a múltiplos estressores observados em determinada região, os mesmos levantados anteriormente. Há relatos de declínios de espécies de abelhas do gênero *Bombus* na Europa, Ásia, América do Sul e América do Norte (Graves *et al.*, 2020; Sang *et al.*, 2024). Na América do Norte, algumas espécies demonstraram declínio gradual ao longo de muitas décadas, enquanto outras espécies apresentaram rápidos declínios apenas nas últimas duas décadas (Cameron; Sadd, 2020; Sang *et al.*, 2024). Também existem relatos de populações saudáveis e estáveis, como no subgênero *Pyrobombus* e para algumas espécies observa-se expansão territorial, como *B. hypnorum*, *B. terrestris*, *B. lapidarius* e *B. soroensis* no Reino Unido; e *B. impatiens*, *B. bimaculatus* e *B. ternarius* no nordeste da América do Norte. *B. terrestris* e *B. impatiens* são associadas ainda a expansões regionais e intercontinentais devido à utilização para polinização de culturas em estufas, bem documentada na Europa e introduzidas em outras regiões com a mesma finalidade. No entanto, essas duas espécies também tornaram uma ameaça para outras espécies de abelhas nativas, por representarem, neste caso, espécies invasoras (Cameron; Sadd, 2020).

Os principais fatores relacionados ao declínio populacional das abelhas do gênero *Bombus* e de outras espécies de abelhas são a perda de habitats, uso de agrotóxicos, mudanças climáticas, transmissão de patógenos e disseminação global de espécies invasoras (Cameron; Sadd, 2020). O status ameaçado de muitas espécies indica a necessidade urgente de monitoramento internacional; 26% de todas as abelhas norte-americanas estão ameaçadas; 45% na América Central; 21% na Europa; e 12,5% na América do Sul, embora a maior parte da espécies sul-americanas não estejam bem catalogadas (Cameron; Sadd, 2020).

O uso da terra está associado ao desenvolvimento urbano e intensificação de atividades agrícolas, que contribuem para a perda de habitats. A perda de habitats representa perda dos locais de nidificação e de recursos florais. A energia para realização de tarefas dentro da colônia é obtida principalmente pelo consumo do néctar (carboidratos), enquanto o pólen (proteínas e lipídios) fornece nutrientes essenciais para o desenvolvimento e reprodução (Cameron; Sadd, 2020; Janousek *et al.*, 2023). A visitação de diversos recursos florais contribui para um aumento da qualidade nutricional das abelhas, enquanto a perda de recursos florais contribui para deficiência nutricional e eleva os custos energéticos para realização da atividade de forrageio. (Graves *et al.*, 2020; Janousek *et al.*, 2023). Esses fatores explicam a vulnerabilidade das espécies de *Bombus* quanto à degradação de habitats.

As abelhas do gênero *Bombus* geralmente são adaptadas ao clima frio e as mudanças climáticas contemporâneas causada pelo aquecimento global estão afetando as distribuições de certas espécies nos biomas. A vulnerabilidade às mudanças de temperaturas varia entre as espécies, prejudicando a capacidade de deslocamento desses animais (Cameron; Sadd, 2020; Herbertsson *et al.*, 2021). As espécies vegetais polinizadas pelas abelhas também são afetadas pelas mudanças climáticas. A diversidade, a floração e a distribuição de plantas nativas são afetadas pelas mudanças climáticas, em associação com a disseminação de espécies de plantas exóticas observada atualmente em diversas regiões no mundo (Gérard *et al.*, 2020; Herbertsson *et al.*, 2021). As reduções da distribuição de plantas nativas são mais prejudiciais também para as espécies de abelhas nativas (Cameron; Sadd, 2020).

A consequência da associação entre perda de habitats e mudanças climáticas contribui para que espécies de abelhas nativas sejam encontradas apenas em determinadas áreas nos ecossistemas (Gérard *et al.*, 2020; Herbertsson *et al.*, 2021). Essa condição

contribui para reduções em abundância e fluxo gênico, levando ao isolamento populacional dessas abelhas. Como reconhecido, populações menores e isoladas são sujeitas à consanguinidade, à redução da diversidade genética e a um risco maior de extinção (Cameron; Sadd, 2020). Jha (2015) discute em seu trabalho realizado no sudoeste dos EUA, que populações de *B. vosnesenskii* estejam restritas em fragmentos de mata em centros urbanos e terras agrícolas e que as consequências do isolamento populacional são observadas nas populações analisadas. Esses fatores podem limitar a capacidade das espécies de *Bombus* em reagir aos múltiplos fatores relacionados ao declínio populacional.

O forrageio em determinada planta realizado por mais de uma espécie de abelha facilita a transmissão de parasitas entre elas, outro fator que contribui para o declínio populacional (Cameron; Sadd, 2020). Alguns exemplos de parasitas encontrados em diversas espécies de abelhas são:

- *Crithidia bombi* – protozoário encontrado no intestino das abelhas. Os efeitos da infecção prejudicam a capacidade de forrageamento, longevidade e fundação de colônias (Blasco-Lavilla *et al.*, 2024).
- *Nosema sp.* - microsporídeos que parasitam espécies de *Bombus*, como *Nosema bombi* e *Nosema ceranae*. As infecções reduzem a eficiência da fundação e desenvolvimento de colônias e a longevidade das abelhas (Gisder *et al.*, 2020; Martinez *et al.*, 2023).
- *Apicystis bombi* – protozoário apontado como uma das causas para o declínio de populações de *Bombus* na América do Sul, também prejudica a aptidão das abelhas e capacidade de manutenção colônias (Aizen *et al.*, 2019).
- Vírus – A ocorrência da infecção causada por vírus em *A. mellifera* é conhecida há muito tempo. No entanto, pesquisas recentes demonstraram a ocorrência também em espécies de abelhas nativas. As hipóteses apontam que disseminação de grande parte de doenças causadas por vírus em espécies de *Bombus* tenha se originado a partir de infestações em *A. mellifera* (Salvarrey *et al.*, 2021; Pascall *et al.*, 2021).
- Agrotóxicos – Abelhas não são alvos da ação dessas substâncias químicas, assim, o que geralmente é observado são efeitos subletais sobre os polinizadores, prejudicando de forma genérica a atividade de forrageio, e o estabelecimento e manutenção de colônias (Toselli; Sgolastra, 2020). Os agrotóxicos também aumentam a suscetibilidade dos polinizadoras a outros estressores ambientais, pois,

dentre outros agravantes, prejudicam as respostas imunológicas desses animais. A exposição a $1 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil aumentou a mortalidade de populações de *A. mellifera* infectadas com *N. ceranae* (Toselli; Sgolastra, 2020).

O grande problema relacionado com estudos de efeitos de agrotóxicos sobre as abelhas do gênero *Bombus* é que grande parte dos estudos são realizados com *A. mellifera*. Alguns estudos com abelhas do gênero *Bombus* concentram-se em espécies europeias e norte-americanas, que apresentam populações estáveis, ou se expandindo no ambiente natural, como *B. terrestris* e *B. impatiens* (Cameron; Sadd, 2020). Estudos com *B. terrestris* expostas a agrotóxicos demonstraram que o estabelecimento de colônias foi prejudicado, reduzindo o número de larvas dentro da colônia. Estudos similares não demonstraram o mesmo em *A. mellifera* quando expostas às mesmas concentrações, indicando que as espécies de *Bombus*, de forma geral, apresentam diferentes sensibilidades em relação à exposição de agrotóxicos. Geralmente as abelhas do gênero *Bombus* são mais sensíveis à exposição a agrotóxicos, de forma que efeitos como redução da capacidade locomotora, de alimentação e atividade de forrageio ocorrem em exposições de menores doses em comparação com as mesmas respostas observadas em *A. mellifera* (Main *et al.*, 2020; Azpiazu *et al.*, 2023). Vários países determinaram restrições e até proibições de alguns princípios ativos. O Canadá impôs recentemente restrições ao uso da imidacloprida, tiametoxam e clotianidina, enquanto os EUA proibiram o uso de alguns produtos contendo clotianidina e tiametoxam (Cameron; Sadd, 2020).

Apesar de estudos de determinados fatores trazerem informações valiosas, ainda não é possível estabelecer uma compreensão efetiva dos efeitos interativos multifatoriais sobre o declínio populacional de espécies de abelhas. A deficiência nutricional causada pela perda de habitats está relacionada com os efeitos de vários outros fatores, mas poucos estudos relacionam os resultados da ação de diversos estressores ao mesmo tempo. O déficit nutricional também está associado a maior vulnerabilidade à infecção por parasitas e patógenos embora o estabelecimento da relação de causalidade seja direto neste caso, o estabelecimento da ligação entre outros fatores é mais complexo e exige mais estudos (Cameron; Sadd, 2020; Abrol; Mondal; Shankar, 2021).

As tentativas para proteção da biodiversidade e funcionamento de ecossistemas saudáveis são irrefutáveis e a garantia efetiva da polinização nos biomas brasileiros enquadra-se neste contexto (Winfrey *et al.*, 2018). Também é categórico que as atividades

antrópicas estejam impactando a biodiversidade das abelhas. No entanto, há a necessidade de mais estudos sobre os efeitos interativos e de longo prazo desses impactos ambientais (Althaus *et al.*, 2021). Algumas espécies de abelhas estão em declínio em muitas regiões do mundo. No entanto, o status de outras espécies é desconhecido e negligenciado. Essa escassez de dados impede a formulação de política para conservação das abelhas, sendo que as decisões regulatórias de líderes mundiais para proteção de espécies de polinizadores sejam urgentes (Ellman *et al.*, 2023). Não é possível responder a perguntas importantes, como a causa de algumas espécies estarem em declínio, enquanto outras apresentam populações estáveis, com capacidade inclusive de expansão territorial. Sem o suporte para permitir comparações de distribuições atuais e históricas de espécies de abelhas nativas, a percepção do declínio e a capacidade de determinar o status de risco são impossíveis de se realizar. Preencher essas lacunas permite realizar políticas concretas para proteção das abelhas nativas e seus serviços ecossistêmicos (Cameron; Sadd, 2020).

2.2.6. Ecotoxicologia

A conscientização e preocupação do meio científico sobre o declínio de populações de espécies de abelhas e suas consequências para a funcionalidade dos ecossistemas e segurança alimentar humana foram intensificados nas últimas décadas. Os primeiros indícios do declínio de populações de polinizadores ocorreram nos anos de 1990, com alta mortalidade observada em *A. mellifera*. A comercialização de agrotóxicos no início da década de 1990 enfatizava a sua eficácia, mas pouco ou nada era proposto sobre os impactos ambientais e os potenciais danos sobre espécies não-alvos (Sgolastra *et al.*, 2020). As práticas observadas na agricultura intensiva atual, estimuladas pela demanda do mercado para aumento da produção, contribuem para todos os fatores relacionados ao declínio de populações de abelhas, principalmente a utilização intensiva de agrotóxicos (Wagner, 2020; Hristov *et al.*, 2021).

Desde a descoberta do diclorodifeniltricloroetano (DDT) por Paul Müller em 1939, centenas de inseticidas foram desenvolvidos. Com o final da Segunda Guerra Mundial, a utilização de agroquímicos tornou-se intensa, período em que a necessidade de aumentar a produção de alimentos para garantir a segurança alimentar dos países era prioridade na agricultura. Desde então, o controle de pragas foi conquistado, principalmente por meio da aplicação de agrotóxicos sintéticos. A questão tornou-se preocupante porque esses agrotóxicos também acabaram afetando as populações de

abelhas, organismos não-alvos de sua ação (Syafudin *et al.*, 2021). Em países em desenvolvimento, esse declínio populacional é inevitável, pois a agricultura intensiva predominante utiliza grandes quantidades de agrotóxicos (Farder-Gomes, 2021).

Programas de monitoramento para a racionalização e conscientização sobre a utilização de agrotóxicos devem ser implementados de forma imprescindível para minimizar impactos ambientais. Esse cenário é observado em países da União Europeia na forma de proibições e restrições ao uso de agrotóxicos (Siviter; Brown; Leadbeater, 2018). Os três países que mais consomem e aplicam agrotóxicos são Brasil, EUA e China, de forma que a utilização por hectare no Brasil (10,9 kg/ha) supera a dos Estados Unidos (2,85 kg/ha) e da China (1,9 kg/ha) (Perobelli, 2025). A utilização de agrotóxicos na agricultura brasileira intensifica a exposição de insetos polinizadores (Bálsamo *et al.*, 2020). Atualmente, estima-se que 30% dos pesticidas utilizados no Brasil são proibidos na União Europeia e outros países, incluindo glifosato, atrazina, clorpirifós e acefato (Siviter; Brown; Leadbeater, 2018; Perobelli, 2025).

Os principais grupos de agrotóxicos utilizados no Brasil são os neonicotinóides (tiametoxam e imidacloprida), piretróides (cipermetrina) e fenilpirazol (fipronil), todos prejudiciais para espécies de abelhas e muitos proibidos em outros países (Pisa *et al.*, 2021). Em regiões agrícolas, agrotóxicos como o fipronil podem persistir por meses ou anos (Singh *et al.*, 2021). Apesar deste cenário, a literatura é insuficiente quanto os efeitos subletais de agrotóxicos sobre as espécies de abelhas nativas (Nogueira *et al.*, 2019). Geralmente esses compostos são derivados sintéticos das defesas naturais das plantas e bastante eficazes contra pragas agrícolas (Yan *et al.*, 2021). As abelhas são sensíveis a esses compostos químicos, que são aplicados de forma sistemática, como em tratamento de sementes antes do plantio (milho e soja), borrifando no solo ao redor das culturas, ou por meio da pulverização (Evans; Chen, 2021). As plantas se desenvolvem e esses compostos químicos, que normalmente são sistêmicos, são absorvidos e permanecem nos tecidos vegetais, contaminando as abelhas que efetuam o forrageio (Mulvey; Cresswell, 2020).

2.2.7. Escassez de Trabalhos Ecotoxicológicos com Abelhas do Gênero *Bombus*

Grande parte dos estudos sobre efeitos de agrotóxicos sobre espécies de abelhas são realizados com a espécie *A. mellifera*. Pesquisas com abelhas nativas são mais restritas e muitos trabalhos envolvendo abelhas do gênero *Bombus* foram realizados com a espécie *B. terrestris*, encontrada na Europa e utilizada para a polinização de culturas em estufa do mundo todo (Abrol; Mondal; Shankar, 2021). A necessidade de pesquisas relacionadas ao efeito subletal de agrotóxicos sobre as abelhas nativas do gênero *Bombus* são imprescindíveis para preservação destes animais em território nacional e para formulações de iniciativas e legislações para garantir a integridade funcional dos biomas brasileiros e a segurança alimentar humana (Boeing *et al.*, 2024; Provase *et al.*, 2024).

A atual pesquisa realizou um levantamento na base de dados bibliográficos da plataforma “Scopus”, para quantificar os trabalhos científicos encontrados relacionados com os efeitos de agrotóxicos em *A. mellifera* e em abelhas do gênero *Bombus*. O levantamento foi realizado para comprovar a escassez de trabalhos ecotoxicológicos relacionados com as abelhas do gênero *Bombus*. Ao selecionar as palavras “*Apis mellifera*” e “pesticides”, a busca indicou 1722 publicações entre os anos de 1970 e 2025 (Fig. 2), enquanto para as palavras “*Bombus*” e “pesticides”, foram encontradas apenas 343 publicações entre os anos de 1987 e 2025 (Fig. 3). Ao selecionar as palavras “*Apis mellifera*” e “fipronil”, a busca indicou 120 publicações entre os anos de 1999 e 2025 (Fig. 4), enquanto para as palavras “*Bombus*” e “fipronil”, a busca indicou apenas 6 publicações, que ocorreram entre os anos de 2018 e 2025 (Fig. 5).

Figura 2 – Levantamento de trabalhos encontrados com as palavras: “*Apis mellifera*” e “Pesticides”

Documents by year

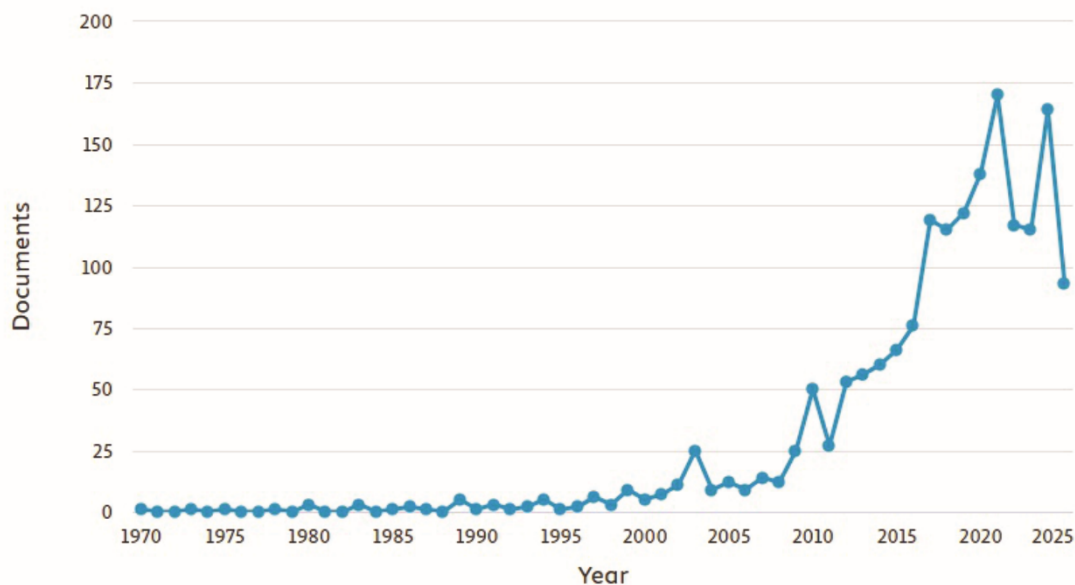


Figura 2 – Levantamento de publicações científicas relacionadas com pesquisas ecotoxicológicas relacionadas com agrotóxicos e abelhas da espécie *A. mellifera*. Fonte: Base de dados bibliográficos da plataforma “Scopus”. Disponível em: <https://www-scopus-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/term/analyzer.uri?sort=plff&src=s&sid=08f7b6a326fdf88ebd247e998fb75f9a&sot=a&sdt=a&sl=63&s=%28TITLE-ABS-KEY%28%22Apis+mellifera%22%29+AND+TITLE-ABS-KEY%28Pesticides%29%29&origin=resultslist&count=10&analyzeResults=Analyze+results>. Acesso em: 23/05/2025.

Figura 3 - Levantamento de trabalhos encontrados com as palavras: “*Bombus*” e “Pesticidas”

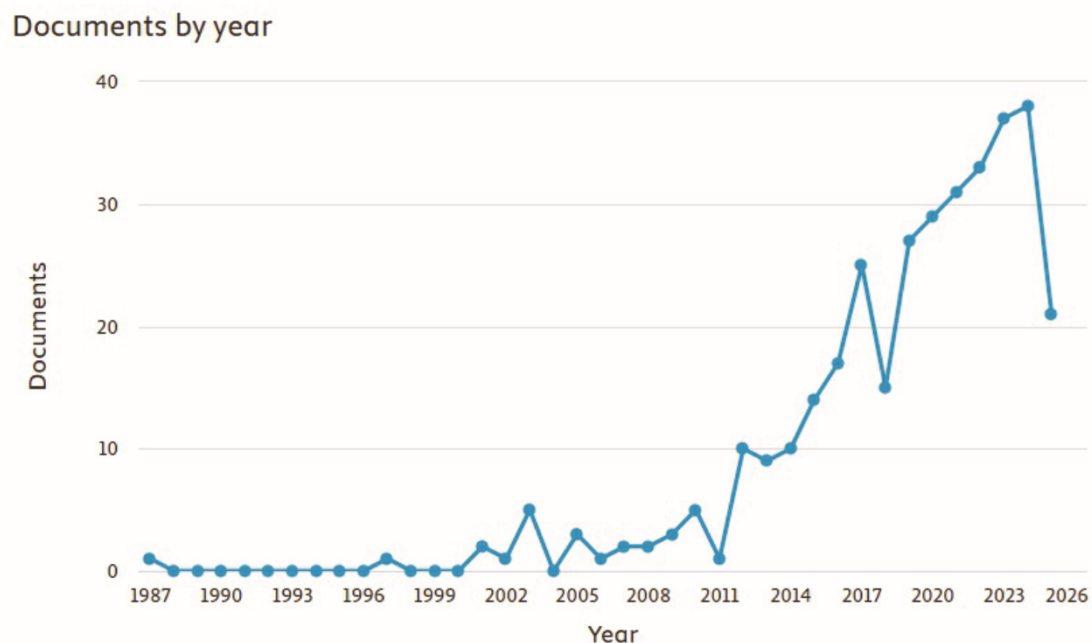


Figura 3 – Levantamento de publicações científicas relacionadas com pesquisas ecotoxicológicas relacionadas com agrotóxicos e abelhas do gênero *Bombus*. Fonte: Base de dados bibliográficos da plataforma “Scopus”. Disponível em: <https://www-scopus-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/term/analyzer.uri?sort=plff&src=s&sid=08f7b6a326fdf88ebd247e998fb75f9a&sot=a&sdt=a&sl=53&s=%28TITLE-ABS-KEY%28Bombus%29+AND+TITLE-ABS-KEY%28Pesticidas%29%29&origin=resultslist&count=10&analyzeResults=Analyze+results>. Acesso em: 23/05/2025.

Figura 4 - Levantamento de trabalhos encontrados com as palavras: “*Apis mellifera*” e “Fipronil”

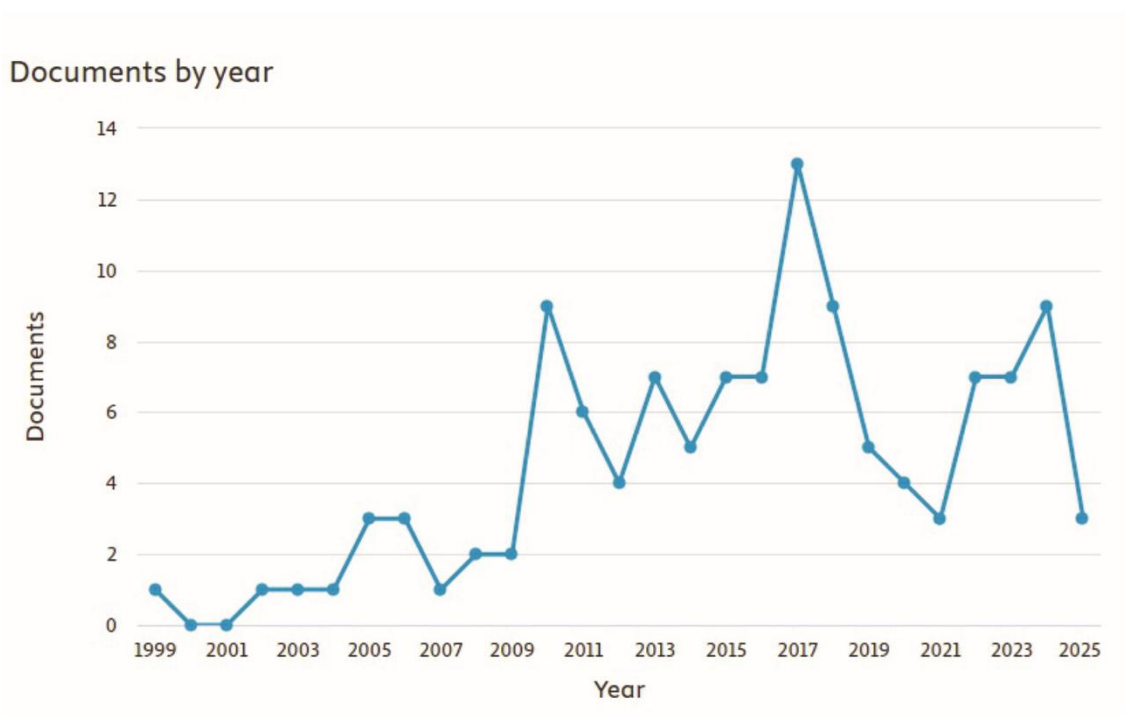


Figura 4 - Levantamento de publicações científicas relacionadas com pesquisas ecotoxicológicas relacionadas com fipronil e abelhas da espécie *A. mellifera*. Fonte: Base de dados bibliográficos da plataforma “Scopus”. Disponível em: <https://www-scopus-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/term/analyzer.uri?sort=plff&src=s&sid=08f7b6a326fdf88ebd247e998fb75f9a&sot=a&sdt=a&sl=59&s=%28TITLE-ABS-KEY%28Apis+mellifera%29+AND+TITLE-ABS-KEY%28Fipronil%29%29&origin=resultlist&count=10&analyzeResults=Analyze+results>. Acesso em: 23/05/2025.

Figura 5 – Levantamento de trabalhos encontrados com as palavras: “*Bombus*” e “Fipronil”

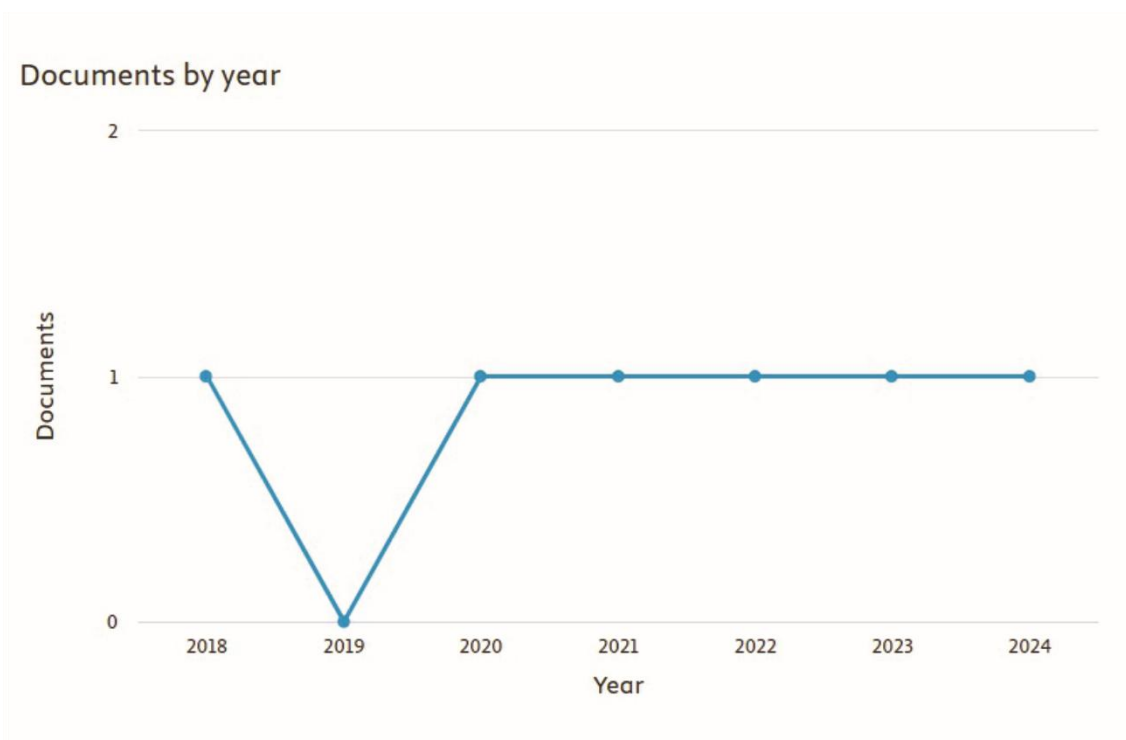


Figura 5 - Levantamento de publicações científicas relacionadas com pesquisas ecotoxicológicas relacionadas com fipronil e abelhas do gênero *Bombus*. Fonte: Base de dados bibliográficos da plataforma “Scopus”. Disponível em: <https://www-scopus-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/term/analyzer.uri?sort=plff&src=s&sid=08f7b6a326fdf88ebd247e998fb75f9a&sot=a&sdt=a&sl=51&s=%28TITLE-ABS-KEY%28Bombus%29+AND+TITLE-ABS-KEY%28Fipronil%29%29&origin=resultlist&count=10&analyzeResults=Analyze+results>. Acesso em: 23/05/2025.

Os levantamentos realizados na base de dados bibliográficos deixaram claras a escassez de trabalhos ecotoxicológicos relacionados com as abelhas do gênero *Bombus* em comparação com *A. mellifera*. Esta espécie, por sua vez, é valorizada em razão dos interesses econômicos associadas com a espécie, enquanto as abelhas do gênero *Bombus*, embora imprescindíveis para manutenção da polinização dos ecossistemas naturais, são negligenciadas ou recebem menor atenção em relação aos esforços para garantir sua conservação. Os dados obtidos pelo levantamento de dados reforçam a importância da atual pesquisa para contribuir com informações sobre os efeitos subletais dos agrotóxicos sobre as abelhas do gênero *Bombus*, sua importância para os biomas brasileiros e a necessidade de sua conservação.

2.2.8. Fipronil

Alta mortalidades de abelhas foi observada na França entre 1994 e 1998, coincidindo com a introdução no mercado de dois novos agrotóxicos, a imidacloprida e o fipronil, amplamente utilizados em plantações de girassol (Rosa *et al.*, 2024). O fipronil é um princípio ativo desenvolvido em 1987 pela Rhône-Poulenc Agro, empresa francesa que atuava no setor agroquímico. O composto foi introduzido comercialmente em 1993 e registrado nos Estados Unidos três anos mais tarde (Rosa *et al.*, 2024). Inicialmente aplicados em sementes, o agrotóxico é absorvido pelas plantas em desenvolvimento e distribuído para os tecidos vegetais (Nauen; Jeschke, 2011). No setor agrícola, o fipronil é utilizado em diversas culturas como arroz, batata, cana-de-açúcar, soja, algodão, cevada, trigo, eucalipto, feijão e milho. No Brasil, o fipronil pode ser encontrado em uma variedade de agrotóxicos com indicações que incluíam aplicação foliar e tratamentos do solo e sementes (Carvalho *et al.*, 2024). As formulações comerciais incluem produtos como Tuit® Florestal (BASF S.A.), Fipronil Nortox 800 WG (Nortox S.A.), Fipronil Nortox Max (Nortox S.A.), Fipronil Alta 250 FS (Nortox S.A.), Regent® 800 WG (BASF), Fipronil CCAB 800 WG (CCAB Agro S.A.), utilizados em plantações de soja, algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, eucalipto, feijão, milho e trigo (Carvalho *et al.*, 2024). O fipronil também é encontrado em formulações de produtos veterinários, muito utilizado em ambientes urbanos para o controle de pragas como baratas, mosquitos, gafanhotos, cupins, carrapatos, pulgas, entre outros (Pereira *et al.*, 2023; Carvalho *et al.*, 2024). Atualmente fipronil pode ser encontrado em solos, águas superficiais e subterrâneas, e sua distribuição representa riscos ao meio ambiente e para organismos não-alvos (Pino-Ortín *et al.*, 2021).

O fipronil é um inseticida do grupo fenilpirazol, antagonista do neurotransmissor ácido gama-amino-butírico (GABA). O fipronil é um agrotóxico que apresenta ação inibitória sobre os receptores pós-sinápticos neuronais, causando estimulação excessiva de neurônios no sistema nervoso dos insetos. A atuação do GABA e de outros neurotransmissores é de grande importância para os polinizadores, uma vez que regulam as vias eferentes motoras, a cognição durante as atividades, coordenação de movimentos durante o forrageio, reconhecimento de plantas, localização espacial, memória e aprendizagem (Lima *et al.*, 2016; Farder-Gomes, 2021). Em condições normais, ao ligar-se a receptores pós-sinápticos, o GABA desencadeia a abertura dos canais de íons Cl⁻, levando à entrada de íons para o meio intracelular, processo conhecido como

hiperpolarização da membrana. Como consequência, ocorre a regulação inibitória do impulso nervoso (Farder-Gomes, 2021). No sistema nervoso central dos insetos, o GABA afeta estruturas como o corpo de cogumelo (Paoli; Galizia, 2021), responsáveis pelo processamento dos odores e pela integração multissensorial da formação de memória. As informações olfativas são fornecidas ao corpo de cogumelo, onde ocorrem sinapses de neurônios conhecidos como células Kenyon (Provase *et al.*, 2024). O bloqueio não competitivo dos receptores de GABA causado pela ação do fipronil, impede a abertura dos canais Cl^- , impedindo o processo de hiperpolarização de neurônios. O processo causa o bloqueio da inibição sináptica e, conseqüentemente, hiperexcitação do sistema nervoso, causando danos para todas as habilidades cognitivas, sensitivas e motoras dos insetos (Fig. 6) (Klein *et al.*, 2017; Riveros; Gronenberg, 2022). O fipronil causa atividade neural excessiva, tremores e paralisia, podendo levar à morte do inseto dependendo da concentração utilizada (Astolfi *et al.*, 2022). A seletividade do fipronil para receptores de GABA em insetos é maior em relevação aos receptores GABAérgicos de mamíferos, o que aumentou a utilidade do fipronil para o controle pragas em áreas agrícolas (Avicor *et al.*, 2023).

Figura 6 - Ação Neurológica do Fipronil

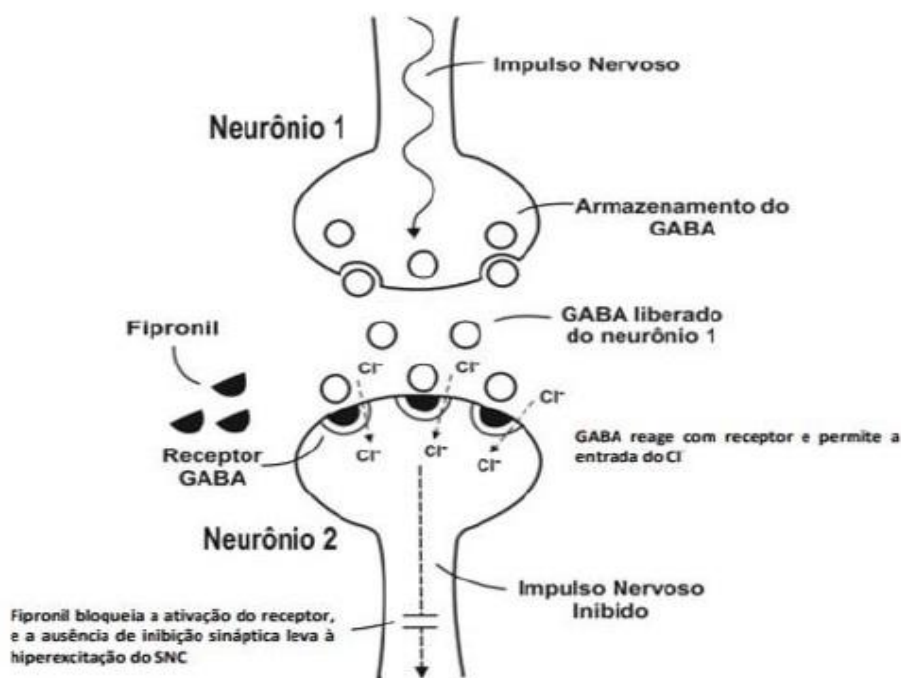


Figura 6 - Ação Neurológica do Fipronil. Ação inibitória do fipronil sobre os receptores pós-sinápticos neuronais, causando estimulação excessiva de neurônios no sistema nervoso dos insetos. Fonte: Adaptação de Bloomquist (2015).

O fipronil apresenta classificação toxicológica III (moderadamente tóxico) e potencial de risco ambiental II (altamente perigoso para o meio ambiente) (Carvalho *et al.*, 2024). A meia-vida do fipronil em sistemas agrícolas é de aproximadamente 18 meses. Quando presente em água com pH ácido ou neutro, pode apresentar meia-vida de 49 meses (Singh *et al.*, 2021). O fipronil pode ser degradado por processos como oxidação, fotólise, hidrólise, biodegradação e vários compostos podem ser formados no ambiente, como sulteto de fipronil e sulfona de fipronil, com toxicidades semelhantes ou maiores em comparação ao composto original (Bhatt *et al.*, 2023). O tempo de permanência desses compostos no ambiente pode variar de 111 a 350 dias, representando riscos para organismos não-alvo (Astolfi *et al.*, 2022).

O fipronil apresenta propriedades sistêmicas, caracterizado pela absorção pelas plantas e distribuição para os tecidos vegetais (Toselli; Sgolastra, 2020). Devido a sua alta toxicidade para pragas, o fipronil é aplicado em baixas concentrações e mesmo assim causa efeitos subletais em organismos não-alvos (Sgolastra *et al.*, 2020). A maior parte das pesquisas ecotoxicológicas dos efeitos letais e subletais da ação do fipronil sobre os polinizadores utilizaram *A. mellifera* como modelo. Países como França, Itália, Alemanha e Eslovênia proibiram a utilização do fipronil em plantações devido a sua alta toxicidade para as espécies de abelhas. No Brasil, a substância foi utilizada em plantações como as de cana-de-açúcar, eucalipto, café e frutas cítricas, de forma que sua aplicação era amplamente efetuada (Castilhos *et al.*, 2019). O sistema de produção agrícola nacional deve adotar formas alternativas de controle de pragas, menos prejudiciais para as espécies de abelhas e, neste contexto, a utilização do fipronil na agricultura brasileira foi proibida, pois embora seja eficaz para o controle de pragas, os danos causados para organismos não-alvos são alarmantes (Carvalho *et al.*, 2024; IBAMA, 2024).

Nos insetos, além do sistema nervoso, o fipronil pode afetar outros órgãos, como os túbulos de Malpighi, prejudicando a capacidade de filtração da hemolinfa e absorção de íons pelas células (Farder-Gomes *et al.*, 2022). A ação do fipronil sobre os túbulos de Malpighi altera as concentrações de íons na hemolinfa, prejudicando a síntese de metaloproteínas, proteínas que apresentam metais na estrutura molecular e que desempenham uma variedade de funções relacionadas à manutenção homeostática no organismo dos insetos (Oliveira *et al.*, 2022). Cobre, ferro e zinco são cofatores de metaloproteínas relacionadas com a ação antioxidante celular contra o estresse oxidativo, degradação de toxinas via citocromo P450, produção de hormônio de muda, respostas

imunológicas, desintoxicação de metais e replicação celular (Amini-Esfidvajani *et al.*, 2022). A interrupção da expressão dessas proteínas pode causar efeitos neurológicos nos insetos e causar alterações comportamentais, prejudicando a atividade de forrageio das abelhas (Oliveira *et al.*, 2022). Os efeitos de doses subletais de fipronil levaram ao estudo da exposição de uma variedade de organismos não-alvos, como abelhas, baratas e lagostas (Rosa *et al.*, 2024).

Muitos trabalhos sobre a ação do fipronil em insetos foram realizados para estimar a sua toxicidade. Pesquisas toxicológicas de exposição a doses subletais via oral em baratas (*Nauphoeta cinerea*) indicaram que o fipronil prejudicou a capacidade olfatória, memória e sensibilidade tátil, interferindo também em respostas neuromusculares. O fipronil causou comportamento de autolimpeza excessiva e diminuição da capacidade exploratória do ambiente. Análises de espectroscopia de raios X de cérebros de *N. cinerea* demonstraram alterações nos níveis de minerais, como cobre, ferro e zinco, bem conhecidos por sua importância na fisiologia e comportamento dos insetos (Farder-Gomes *et al.*, 2022). As mesmas observações ocorrem em abelhas. O armazenamento de minerais em células dos insetos envolve mecanismos de transporte em diferentes órgãos, como trato digestório, corpo gorduroso, e túbulos de Malpighi (Farder-Gomes *et al.*, 2022; Rosa *et al.*, 2024).

Pesquisas realizadas por Holder *et al.* (2018) concluíram que *A. mellifera* expostas ao fipronil apresentaram o composto no organismo após seis dias, demonstrando também capacidade de bioacumulação. Análises da exposição ao fipronil no intestino médio realizado com a abelha da espécie *Partamona helleri* demonstraram aumento nas atividades das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), morte celular por apoptose e diminuição na atividade de proteínas da via de sinalização relacionadas à proliferação e diferenciação celular (Farder-Gomes *et al.*, 2021). Essas enzimas são as principais vias antioxidantes em abelhas e desempenham funções importantes para diminuição do dano oxidativo nas células (Margotta *et al.*, 2018; Farder-Gomes *et al.*, 2021).

Pesquisas realizadas por Astolfi *et al.* (2022) com *A. mellifera* concluíram que forrageiras expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil apresentaram alterações relacionadas ao metabolismo, especificamente na biossíntese de proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e aminoácidos, nos processos de transcrição e tradução do DNA, no processamento de proteínas e alterações de mecanismos antioxidantes. Esses resultados

foram causados devido à supressão de determinados grupos de genes, prejudicando a saúde e sobrevivência das abelhas. O fipronil afetou a produção e o transporte de adenosina trifosfato (ATP), síntese da enzima que atuam na lise da celulose e amido, e em proteínas relacionadas ao transporte e metabolismo de carboidratos e íons inorgânicos. A exposição ao fipronil também pode afetar a capacidade de absorção de nutrientes pelo intestino, causar fadiga, prejudicando atividades do forrageio e outras tarefas realizadas por operárias. De forma simultânea, os pesquisadores observaram que as abelhas não deixaram de se alimentar, o que aumenta o risco de contaminação dentro da colônia, uma vez que os alimentos contaminados não são rejeitados pelas abelhas forrageiras de *A. mellifera*. O mesmo poderia ocorrer com as abelhas nativas do gênero *Bombus*.

2.2.9. Rota de Exposição

A população humana aumentou rapidamente nos últimos 200 anos, tornando a segurança alimentar uma tarefa desafiadora. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), mais de 815 milhões de pessoas estão em situação de fome, de forma que a produção global de alimentos precisaria aumentar em aproximadamente 50% até 2050 para atender cerca de nove bilhões de pessoas (Hafeez *et al.*, 2023). Os preços das colheitas variam dependendo da oferta e demanda no mercado e a única maneira dos agricultores aumentarem seus lucros é diminuindo os custos de produção, comprometendo o mínimo possível o rendimento das colheitas (Zanin *et al.*, 2022). Por outro lado, os recursos naturais necessários para a produção agrícola estão cada vez mais escassos. Neste contexto, as técnicas tradicionais para aumentar a produção de alimentos, como a aplicação de agrotóxicos, ainda é largamente utilizada para a maximização das produções no mundo todo (Hafeez *et al.*, 2023). Os agrotóxicos apresentam um papel vital no agronegócio, necessários para o aumento da produtividade agrícola, embora sejam prejudiciais aos seres humanos e para as relações ecológicas nos ecossistemas (Vikram, 2020). Como os benefícios da aplicação de agrotóxicos para o aumento da produção agrícola são incontestáveis e não existe possibilidade que sua total suspensão seja efetivada, é necessário formas mais específicas de ação que minimizem o acometimento de organismos não-alvos (Hennig *et al.*, 2023).

Os produtores também podem ser contaminados pelos agrotóxicos durante as pulverizações, com a possibilidade de desencadear uma série de complicações para a saúde, como câncer e doenças respiratórias; enquanto a contaminação ambiental afeta as

cadeias alimentares e causa complexos impactos ambientais (Chaitanya *et al.*, 2020). Existem três maneiras de reduzir as pulverizações: reduzir as aplicações durante o período de cultivo, o que pode comprometer o rendimento da colheita; diminuir a dose aplicada, o que pode diminuir o nível de controle de pragas; e restringir o tamanho das áreas tratadas (Zanin *et al.*, 2022). Cerca de 30% a 50% dos agrotóxicos aplicados são perdidos lixiviados devido ao escoamento ou pela ação de correntes de ar durante o processo de aplicação (Xun *et al.*, 2023). As técnicas de manejo para controles biológicos são importantes ferramentas para a racionalização da aplicação de agrotóxicos, que continuam sendo mais eficientes e indispensáveis para o controle de pragas em sistemas agrícolas (Xun *et al.*, 2023). Esses fatores causam consequências indesejáveis, como a exposição de espécies de abelhas nativas (Abrol; Mondal; Shankar, 2021).

As abelhas são frequentemente expostas a vários resíduos de agrotóxicos ao realizar o forrageio em regiões agrícolas e seus entornos (Decourtye *et al.*, 2023). A rota de exposição das abelhas nativas contaminadas pelo fipronil está relacionada principalmente com o processo de pulverização. O fipronil pode ser aplicado de duas maneiras em sistemas agrícolas, na forma sólida, diretamente no solo, e na forma líquida por meio da pulverização de folhas e flores (Carvalho *et al.*, 2024). Atualmente a pulverização é cada vez mais associada a tecnologias que utilizam máquinas e drones que abrangem maiores áreas e realizam o trabalho em menor período de tempo, de maneira precisa e rápida (Hafeez *et al.*, 2023).

As principais vias de exposição das abelhas aos agrotóxicos são por meio de contato, oral e por inalação. A via por contato ocorre quando as abelhas entram em contato com gotículas de agrotóxicos à deriva no ar e espalhadas após as pulverizações. A via oral ocorre pela ingestão de resíduos contaminados pelos agrotóxicos, como pólen e néctar. A contaminação por inalação ocorre quando há inalação de agrotóxicos voláteis durante ou após a pulverização (Sanchez-Bayo; Goka, 2014; Naharki; Regmi, 2020). A toxicidade de agrotóxicos hidrofóbicos ocorre principalmente por via contato de exposição, enquanto a toxicidade de agrotóxicos hidrofílicos e sistêmicos, como o fipronil, ocorre principalmente por via oral de resíduos no pólen e no mel contaminados após a pulverização (Sanchez-Bayo; Goka, 2014; Carvalho *et al.*, 2024). A inalação de agrotóxicos voláteis perto de culturas tratadas é considerada uma via secundária de exposição para a maioria dos agrotóxicos (Sanchez-Bayo; Goka, 2014). A capacidade sistêmica do fipronil permite com que permaneça disponível durante meses nos tecidos

vegetais. Os efeitos da exposição ao longo do tempo causam danos aos indivíduos e as colônias (Sgolastra *et al.*, 2020).

Os efeitos individuais de doses subletais de fipronil afetam a longevidade, causam tremores e paralisia e reduzem a capacidade de orientação espacial, memória, alimentação, habilidades cognitivas e motoras (Astolfi *et al.*, 2022). Nas colônias, as abelhas apresentam comportamentos incomuns como autolimpeza excessiva, incapacidade de substituição da rainha (Toselli; Sgolastra, 2020) (Fig. 7). Todos esses efeitos podem contribuir para o declínio populacional de espécies de abelhas (Wakgari; Yigezu, 2021).

Figura 7 – Rota de Exposição



Figura 7 – Rota de Exposição ao Fipronil. Rota de exposição das abelhas do gênero *Bombus* ao fipronil em sistemas agrícolas e os efeitos da toxicidade em nível individual e para colônias. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

A aplicação do fipronil por meio da pulverização foi suspensa em todo território nacional em 2024. Antes desse período, a pulverização era proibida apenas nos períodos de floradas. Os agricultores ainda podem realizar aplicações em sementes e no solo. A decisão foi tomada como medida cautelar, devido aos impactos sobre as populações de

abelhas. As incertezas sobre a deriva do destino do fipronil no ambiente após as pulverizações fez com que sua aplicação fosse vetada. Nessas circunstâncias, a proibição do fipronil direciona o Brasil em melhores práticas globais, como a preservação da biodiversidade (IBAMA, 2024).

2.2.10. Avaliações de Risco

O Brasil está entre os cinco maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, com aumento do consumo de ingredientes ativos em 152%, de 28382 para 71663 toneladas ao longo de 15 anos. Os testes toxicológicos do fipronil sobre espécies de abelhas foram levantados em diversos trabalhos, indicando alta suscetibilidade dos polinizadores (Santos; Otesbelgue; Blochtein, 2018). Os agrotóxicos sistêmicos como o fipronil podem ser absorvidos pelas raízes e folhas e serem transportados para outros tecidos vegetais, permanecendo durante semanas ou meses (Naharki; Regmi, 2020). Como resultado do uso extensivo, essas substâncias são encontradas em ambientes terrestres e aquáticos. A contaminação ambiental ocorre pelos ventos, escoamento de águas superficiais e subterrâneas, absorção pelas plantas contaminando pólen, néctar e fluidos de gutação (Naharki; Regmi, 2020; Carvalho *et al.*, 2024). A triagem de amostras ambientais das áreas de entorno onde essas substâncias são aplicadas apresentam misturas de agrotóxicos e seus metabólitos. Em geral, há fortes indícios de que solos, cursos d'água e plantas de ambientes agrícolas e urbanos estejam contaminados com concentrações ambientais variáveis de misturas de agrotóxicos (Tudi *et al.*, 2021).

Muitas vezes as informações sobre quando, onde e como os produtos químicos são aplicados não estão prontamente disponíveis e os níveis de exposição não podem ser quantificados (Sgolastra *et al.*, 2020). A regulamentação de agrotóxicos deve ser baseada em evidências científicas sólidas e atualizadas, por meio das quais produtos com potencial para causar desequilíbrios ambientais não sejam aprovados ou prontamente removidos do mercado. Diante da incerteza científica, o princípio da precaução deve prevalecer (Sgolastra *et al.*, 2018). Antes de serem autorizados, os agrotóxicos passam por um processo de Avaliação de Risco para garantir que não causem danos irreparáveis aos ecossistemas (Sgolastra *et al.*, 2020).

As Avaliações de Risco são realizadas para estipular a toxicidade dos agrotóxicos e têm como objetivo analisar se a utilização de determinada substância é segura, de acordo

com os termos de uso formulados pelos fabricantes (Carvalho *et al.*, 2024). As Avaliações de Risco passam por algumas etapas associadas a Diretrizes para Testes de Produtos Químicos da Organização Internacional para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD). Os testes de toxicidade seguem protocolos internacionais que estabelecem métodos para avaliar a toxicidade de agrotóxicos sobre as abelhas (Carvalho *et al.*, 2024). Genericamente, as Avaliações de Risco consistem em uma série de ensaios com base na exposição aguda para estimativas da concentração letal mediana (CL₅₀) e da dose letal mediana (DL₅₀), que podem ser levantadas por meio de exposições via oral e por contato, realizadas experimentalmente durante um determinado período de tempo (Sanchez-Bayo; Goka, 2014). Ambos os parâmetros correspondem à dose responsável pela mortalidade de 50% dos indivíduos avaliados nos testes em determinado período de tempo. Esses parâmetros apresentam grande importância para a avaliação da toxicidade de diferentes substâncias, pois permitem estabelecer limites seguros de exposição para proteger a saúde humana e o meio ambiente. Assim, os valores da DL₅₀ e a CL₅₀ podem ser utilizados para classificação e rotulagem de produtos químicos, fornecendo informações para o manuseio dessas substâncias (OECD 1998a, 1998b; Naharki; Regmi, 2020; Carvalho *et al.*, 2024).

A DL₅₀ é realizada por meio da aplicação de uma única dose de uma substância, e expressa em massa da substância por massa do animal. A CL₅₀ é a concentração de determinada substância encontrada no ar ou na água e expressa em unidades massa/volume (Naharki; Regmi, 2020; Carvalho *et al.*, 2024). Algumas pesquisas realizaram testes para estimar os valores de CL₅₀ e DL₅₀ do fipronil em abelhas, principalmente para em *A. mellifera* (Carvalho *et al.*, 2024). Estudo realizado por Carvalho *et al.* (2024) avaliaram a CL₅₀ via oral do fipronil para *A. mellifera* e para abelha nativa da espécie *Scaptotrigona bipunctata*, expostas durante 72 horas. Os valores de CL₅₀ foram de 0,0204 ng µL⁻¹ para *A. mellifera*, e 0,0031 ng µL⁻¹ para *S. bipunctata*, indicando que a espécie nativa é mais sensível à exposição aos agrotóxicos em relação às abelhas melíferas.

Sanchez-Bayo e Goka (2014) realizaram um levantamento sobre dados encontrados em Avaliação de Risco de diversos agrotóxicos sobre as abelhas melíferas e do gênero *Bombus*. Os dados sobre a toxicidade para *A. mellifera* foram obtidos por meio do Manual de Pesticida (Tomlin, 2009), do banco de dados ECOTOX da Agência de Proteção Ambiental dos EUA e do Banco de Dados AgriTox da Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail da França. Os

dados sobre a toxicidade de alguns agrotóxicos para abelhas do gênero *Bombus* eram mais escassos e foram obtidos por meio de levantamento bibliográfico realizado pelos pesquisadores. As toxicidades por via oral e por contato foram levantadas em períodos de exposições realizados durante uma média de 48 horas. Os levantamentos realizados pelos pesquisadores revelaram que, em geral, a sensibilidade de *A. mellifera* por exposição oral ao fipronil é semelhante à de abelhas *Bombus* e que a DL_{50} em *A. mellifera* é de 0,001 μg por abelha. Os pesquisadores também discutiram que, apesar do fipronil ser altamente tóxico para as abelhas, sua baixa prevalência no pólen, cerca de 5%, garante que seus riscos sejam menores em comparação com os de neonicotinoides e inibidores da atividade de colinesterase. Em relação à exposição por contato, para *A. mellifera* a DL_{50} do fipronil foi de 0,007 μg por abelha. No entanto, o risco da exposição via contato é pequeno. As mesmas estimativas de valores da DL_{50} da exposição ao fipronil para *A. mellifera* foram apontadas por Naharki e Regmi (2020), que tabelaram valores de DL_{50} de alguns agrotóxicos amplamente utilizados, dentre eles o fipronil.

As Avaliações de Risco contribuíram para melhoria do entendimento e capacidade para identificar ameaças dos agrotóxicos para as abelhas (Sgolastra *et al.*, 2020). Após a regulamentação de uma formulação, o contínuo monitoramento é necessário para verificar se as suposições da Avaliação de Risco são atendidas em condições realísticas de campo (Sgolastra *et al.*, 2018). No entanto, atualmente, as Avaliações de Risco apresentam uma série de problemas:

1) *Condições fisiológicas das abelhas*

Nos ensaios realizados, condição fisiológica das abelhas, como fatores genéticos, tamanho corporal e idade podem influenciar a sensibilidade aos agrotóxicos (Sgolastra *et al.*, 2018).

2) *Concentrações superestimadas*

Alguns estudos foram realizados com concentrações superestimadas e não avaliaram as exposições realísticas encontradas em campo (Sgolastra *et al.*, 2018).

3) *Suscetibilidade variável de diferentes espécies de abelhas*

As Avaliações de Risco atualmente são realizadas de forma genérica em *A. mellifera*. No entanto, diferentes espécies apresentam sensibilidade variada quanto aos efeitos dos agrotóxicos (Sgolastra *et al.*, 2020). Espécies de abelhas nativas geralmente

são mais sensíveis às exposições em relação às abelhas melíferas (Sgolastra *et al.*, 2018). Devido à escassez informações, os parâmetros obtidos com os testes em *A. mellifera* e extrapolados para as demais espécies de abelhas, embora de maneira inapropriada (Sgolastra *et al.*, 2020).

4) *Sinergismo*

Os ambientes agrícolas são contaminados com combinações variadas de agrotóxicos e as abelhas são frequentemente expostas a combinações, o que pode agravar os efeitos sobre as abelhas expostas. A forma como os compostos químicos, quando combinados, resultam em determinado efeito em um determinado biomarcador é chamado sinergismo (Sgolastra *et al.*, 2018).

Atualmente, as Avaliações de Risco são realizadas de forma individualizada para cada formulação, enquanto no ambiente as espécies não-alvos são simultaneamente expostas a diversas substâncias. Como consequência, embora essenciais para levantamento do potencial toxicológico, os riscos ambientais causados pela exposição a diversos agrotóxicos permanecem subestimados (Farder-Gomes *et al.*, 2021). Atualmente, existem cerca de 1000 agrotóxicos diferentes no mercado, sendo impossível avaliar a toxicidade de todas as combinações e potenciais efeitos prejudiciais sobre os polinizadores (Sgolastra *et al.*, 2018). No entanto, as combinações dos agrotóxicos mais utilizados nos sistemas agrícolas necessitam de maior atenção (Toselli; Sgolastra, 2020).

5) *Efeitos Subletais*

Os efeitos subletais geralmente não são considerados em Avaliações de Risco e há uma escassez de dados, apesar do potencial efeito prejudicial para os polinizadores (Carvalho *et al.*, 2024). A identificação de efeitos subletais e a longo prazo são necessários, pois os impactos da ação dos efeitos sobre as espécies de polinizadores ainda não são claros. Os efeitos subletais como comprometimento do voo, navegação ou capacidade de forrageio são negligenciados (Naharki; Regmi, 2020). Pesquisadores discutem que seja impossível avaliar adequadamente a extensão total dos riscos associados ao uso contínuo de agrotóxicos sistêmicos (Rosa *et al.*, 2024). No entanto, pesquisas toxicológicas muitas vezes negligenciam os efeitos subletais dos agrotóxicos sobre espécies nativas, o que poderia contribuir com informações imprescindíveis para o entendimento da toxicidade dos compostos em cenários realísticos nas Avaliações de Risco para minimizar os impactos ambientais.

A dificuldade para identificar os efeitos subletais são frequentes, pois as abelhas estão em situação de estresse em condições experimentais. Essas condições podem camuflar os efeitos reais causados pelas exposições de doses subletais (Sgolastra *et al.*, 2018). A atual pesquisa enfatiza que as doses subletais correspondem às doses reais em que os polinizadores são expostos no ambiente. Exposições a doses letais não representam um cenário realístico (Carvalho *et al.*, 2024). Além disso, embora a autorização para a utilização de agrotóxicos deva passar por Avaliações de Risco, a estrutura regulatória é falha em avaliar os riscos resultantes do uso generalizado e simultâneo desses compostos (Naharki; Regmi, 2020).

O comprometimento da capacidade de orientação durante os voos ocorre em abelhas expostas a doses subletais de agrotóxicos, de forma que 31,6% das abelhas forrageiras de *A. mellifera* não retornam para as colônias. O sistema imunológico também é prejudicado, fazendo com que a exposição contínua aumente a vulnerabilidade a doenças, o que aumenta a taxa de mortalidade e diminui a longevidade das abelhas. Os efeitos também podem causar alterações na microbiota intestinal e prejudicar a expressão do gene relacionados com o sistema imunológico, nutrição e síntese de enzimas envolvidas aos processos metabólicos da respiração (Naharki; Regmi, 2020).

2.2.11. Sistema Hepatonefroclítico

O sistema hepatonefroclítico (SHN) é uma combinação de tecidos formados por uma camada externa constituída pelo corpo gorduroso e uma camada interna formada pelas células pericárdicas (Fig. 8). Os dois tecidos formam um sistema concêntrico em torno do vaso dorsal. A região conhecida como “coração” fica situada na porção mediana do abdômen da abelha, em uma camada mais espessa do vaso dorsal com atividade miogênica (Abdalla; Domingues, 2015; Inoue *et al.*, 2022). Os hemócitos, células do sistema imunitário, são encontrados nos espaços entre as células de ambos os tecidos, ou no interior do vaso dorsal. A hemolinfa passa de forma sequencial através das células do corpo gorduroso, depois pelas células pericárdicas, para finalmente acessar o vaso dorsal (Abdalla; Domingues, 2015).

Figura 8 - Sistema Hepatonefrocítico (SHN)

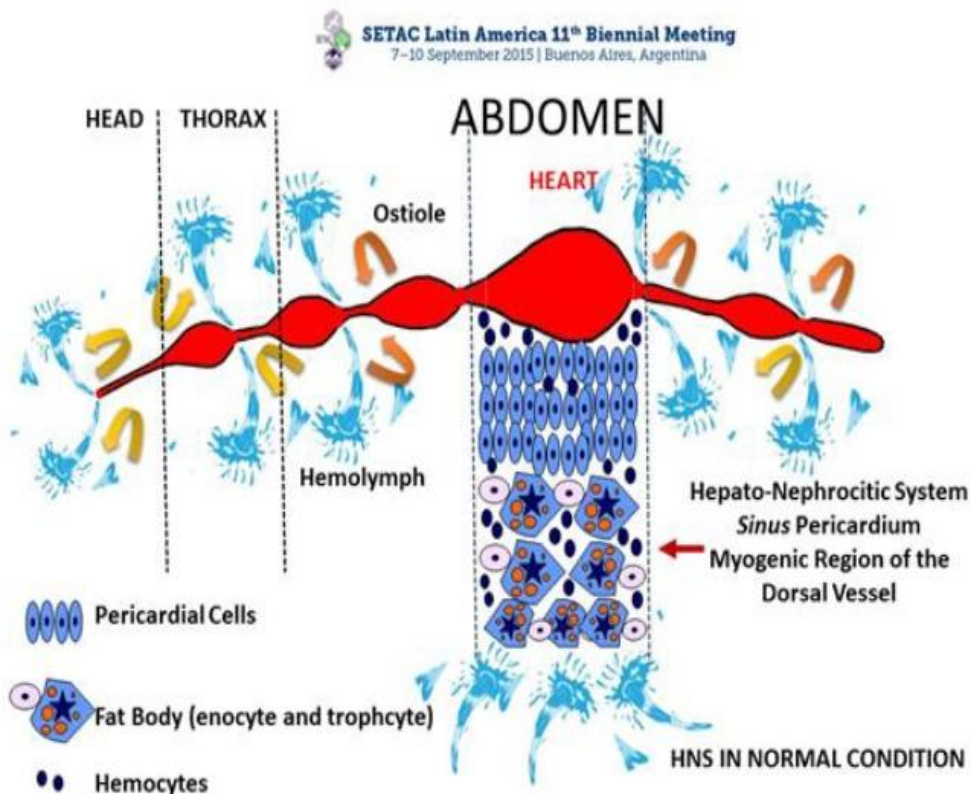


Figura 8 - Esquema do Sistema Hepatonefrocítico. Fonte: Abdalla, 2015. Disponível em: SETAC Latin America 11^a Biennial Meeting.

O corpo gorduroso é distribuído em uma camada abaixo do tegumento (compartimento parietal) e outra ao redor dos órgãos internos (compartimento visceral). Dois grupos celulares são os principais constituintes do corpo gorduroso, os trofócitos e os enócitos. Em muitas espécies de insetos, trofócitos e enócitos estão localizados de forma dispersa, sem uma orientação definida, como em abelhas do gênero *Bombus* ou em *A. mellifera*. Em outras espécies, trofócitos e enócitos estão distribuídos em camadas e separados por espaços livres, sendo que cada camada apresenta somente um grupo celular, como em *Drosophila melanogaster* (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021).

Os trofócitos e enócitos estão relacionados com processos endócrinos e múltiplas funções metabólicas, como a síntese, armazenamento e liberação de substâncias fundamentais para o organismo dos insetos (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). Essas células ficam em contato com a hemolinfa, facilitando a troca de metabólitos (Inoue *et al.*, 2022). Assim, o corpo gorduroso constitui a sede principal do metabolismo intermediário e processos de desintoxicação (Brejcha *et al.*, 2023). As células do corpo

gorduroso também estão relacionadas com a biossíntese de ésteres e vitelogenina e no armazenando de conteúdos energéticos disponibilizados ao organismo quando necessários (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021; Stec; Saleem; Darveau, 2021). Trofócitos e enócitos possuem origens embriológicas distintas e são separados por uma delgada lâmina basal, imperceptível pelas fotomicrografias nesta pesquisa. Apesar de enócitos estarem intimamente associados próximos aos trofócitos em abelhas do gênero *Bombus*, os dois grupos celulares apresentam diferenças morfológicas e funcionais (Lu *et al.*, 2021).

Os trofócitos são células polimórficas com núcleo ramificado e de origem mesodérmica. São responsáveis pelo armazenamento e secreção de substâncias e principal sede do metabolismo intermediário dos insetos (Assis *et al.*, 2022; Brejcha *et al.*, 2023). Mitocôndrias, aparelho de Golgi e retículo endoplasmático granular são frequentes no citoplasma dessas células, assim como muitas granulações de tamanhos variados para armazenamento de moléculas como proteínas, triglicerídeos e glicogênio disponibilizados conforme a demanda energética do organismo (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021; Brejcha *et al.*, 2023). A presença de proteínas nos grânulos citoplasmáticos de trofócitos também está associada com a produção de vitelogeninas (Szczepankiewicz; Simiczyjew, 2024). As vitelogeninas são produzidas pelos trofócitos, liberadas na hemolinfa e absorvidas pelos ovócitos. Nessas células, são convertidas em vitelinas e associadas com a reserva nutritiva para o desenvolvimento embrionário (Harwood; Amdam, 2021). Dessa forma, o número de trofócitos geralmente é menor em insetos machos em comparação com as fêmeas (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). Grânulos de hemossiderina também podem ser encontrados no citoplasma de trofócitos e disponibilizadas como ferritina, proteínas associadas ao transporte de oxigênio na hemolinfa (Adameyko *et al.*, 2021). Dessa forma, os trofócitos regulam a composição do meio circundante dos insetos, atendendo suas necessidades metabólicas imediatas (Kovalskyi; Zhmur, 2024).

Os enócitos são células circulares ou ovais, de origem ectodérmica e com citoplasma acidófilo. Os enócitos são considerados análogos aos hepatócitos de mamíferos, pois partilham genes homólogos, que codificam o metabolismo e processamento de lipídios e proteínas (Grigoraki; Grau-Bove; Carrington-Yates, 2020). Essas células apresentam núcleo central, muitas mitocôndrias, retículo endoplasmático agranular e complexo de Golgi bem desenvolvidos, relacionados com a síntese de

hidrocarbonetos e lipídios incorporados aos constituintes da epicutícula dos insetos (Lu *et al.*, 2021). Alguns carboidratos também são sintetizados nos enócitos e disponibilizados na hemolinfa dos insetos. Essas células também apresentam grânulos lipídicos, proteicos e de glicogênio em seu citoplasma (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). Os enócitos são distribuídos por todo o corpo gorduroso e menos abundantes em comparação aos trofócitos. Outra função de grande importância desse grupo celular são os processos envolvendo a desintoxicação e regulação da composição da hemolinfa (Hsu; Weng, 2021).

Diferentemente de outros insetos, as abelhas não apresentam muitos grupos de genes relacionados com a desintoxicação substâncias tóxicas e geralmente apresentam metade dos grupos de genes em comparação com outros insetos. As enzimas da família do citocromo P450 estão relacionadas com a neutralização de agrotóxicos e outros compostos químicos e são sintetizadas principalmente pelos enócitos (Darragh; Nelson; Ramírez, 2021). A neutralização de substâncias tóxicas está relacionada com a ativação do citocromo P450, associado com a resistência a agrotóxicos (Haas *et al.*, 2022). O citocromo P450 é uma grande superfamília de heme proteínas encontradas nos metazoários, nas bactérias, arqueas e eucariotos (Haas *et al.*, 2022), responsáveis pela neutralização de substâncias tóxicas por meio de reações oxidativas (Haas *et al.*, 2022; Haas; Nauen, 2021). Existe enorme diversidade entre essas enzimas, em que o grupo CYP3 é o maior e mais dinâmico em insetos e frequentemente ligado à resistência e metabolização de substâncias tóxicas. Assim, qualquer xenobiótico torna-se um substrato para essas enzimas, que atuam sobre compostos endógenos, como ácidos graxos e hormônios esteróides, e exógenos, como os agrotóxicos (Darragh; Nelson; Ramírez, 2021). Embora o processo de biotransformação realizada pelos enócitos seja de grande importância para a sobrevivência dos insetos, a ação do citocromo P450 também pode causar danos ao organismo, como a formação de metabólitos tóxicos e alterações no padrão de indução de enzimas que podem ter impacto na metabolização de outras substâncias tóxicas (Hayward; Hunt; Haas, 2024).

As células pericárdicas são de origem mesodérmica, apresentam membrana plasmática com muitas invaginações, formando extenso labirinto periférico do qual brotam vesículas endocíticas. A função dessas células é a filtragem e neutralização de substâncias da hemolinfa (Inoue *et al.*, 2022; Zavodska; Sehadova, 2023). Substâncias que os túbulos de Malpighi não excretaram podem ser tóxicas para o organismo dos

insetos. As células pericárdicas neutralizam essas substâncias, retornando os metabólitos para hemolinfa em condições a serem excretados novamente pelos túbulos de Malpighi (Zavodska; Sehadova, 2023). Essas células localizam-se em cordões ao redor do vaso dorsal, espalhadas entre o corpo gorduroso. À medida que efetuam a filtração, as células pericárdicas entram em estágios de ativação mediante os vacúolos formados por sua atividade pinocítica (Kaabeche *et al.*, 2024). Desta forma, as células pericárdicas podem ser classificadas em diferentes estágios de ativação (Abdalla; Domingues, 2015).

As células pericárdicas podem ser classificadas em quatro estágios de ativação. No estágio I, apresentam arranjo epitélíode, são colunares, com núcleo central e não apresentam vacúolos citoplasmáticos. No estágio II, ocorre a presença de pequenos vacúolos que fundem, fazendo com que a área celular aumente de tamanho. O estágio III caracteriza-se por um vacúolo central maior e poucos periféricos pequenos, ocorrendo um pequeno deslocamento do núcleo para a periferia da célula. No estágio IV, as células são maiores, apresentam contorno irregular e um grande vacúolo ocupa quase toda a área da célula, o que causa o deslocamento do núcleo para a periferia do citoplasma. Nesta fase, as células adquirem capacidade máxima de absorção de substâncias da hemolinfa (Abdalla; Domingues, 2015). As células pericárdicas respondem rapidamente à exposição a toxicantes. Entretanto, se o estágio IV for atingido, a parede muscular do vaso dorsal é afetada e as abelhas podem morrer (Abdalla; Domingues, 2015). Por outro lado, a atividade pinocítica executada continuamente, principalmente devido à exposição a agrotóxicos, também pode causar danos ao organismo da abelha, mesmo as células pericárdicas não atingindo o estágio IV de ativação. A atividade constante das células pericárdicas também pode ser prejudicial ao organismo das abelhas, pois pode desidratá-las, retirando água e uma variedade de nutrientes que poderiam ser utilizados por outras células e tecidos (Abdalla; Domingues, 2015; Domingues *et al.*, 2017).

O SHN é a primeira barreira para neutralização de compostos químicos presentes no organismo dos insetos. Todas as células do SHN respondem em sincronização em uma série temporal de eventos (Abdalla; Domingues, 2015; Inoue *et al.*, 2022). Abdalla e Domingues (2015) observaram que se o corpo gorduroso colapsar pela exposição ao cádmio, as células pericárdicas são ativadas. Esses eventos não ocorrem ao mesmo tempo, primeiro as células do corpo gorduroso colapsam e, em seguida, as células pericárdicas são ativadas, alcançando os estádios III ou IV, dependendo da toxicidade da substância.

A ativação do sistema imunitário, por meio dos hemócitos, é constante ao longo de todo processo de intoxicação (Abdalla; Domingues, 2015).

2.2.12. Biomarcadores de Efeito

A avaliação da toxicidade de doses letais dos agrotóxicos é estimada nas Avaliações de Risco, que normalmente negligenciam os efeitos das doses subletais (Astolfi *et al.*, 2022). Dessa forma, é necessária a utilização de biomarcadores de efeito, originalmente definidos como qualquer alteração bioquímica, morfológica, histológica, fisiológica e comportamental frente ao estresse ambiental (NRC, 1987; Nicewicz *et al.*, 2021). A análise dos efeitos do fipronil sobre as células de um determinado órgão pode fornecer informações sobre a toxicidade do agrotóxico e possibilita concluir se determinada exposição prejudica as abelhas (Abdalla; Domingues, 2015). Nesse contexto, a atual pesquisa faz-se necessária mediante a escassez de trabalhos envolvendo o efeito subletal do fipronil sobre as abelhas do gênero *Bombus*. Os efeitos desse agrotóxico são bem documentados para outras espécies de abelhas, principalmente para *A. mellifera*. A ausência de pesquisas relacionadas com efeitos subletais de pesticidas sobre as abelhas do gênero *Bombus* representa uma lacuna importante na literatura científica para o entendimento da ação toxicológica dos agrotóxicos e os danos ambientais sobre os biomas brasileiros (Abdalla; Domingues, 2015; Nogueira *et al.*, 2019).

Um exemplo da utilização de biomarcadores para estimar os efeitos toxicológicos dos agrotóxicos foi realizado por Abdalla *et al.* (2018) para avaliar os efeitos da exposição de 1 $\mu\text{L L}^{-1}$ de Cloreto de cádmio sobre as células do ovário de *B. morio*, concentração considerada segura pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). A espécie *B. morio* é filogeneticamente próxima de *B. atratus* e o ciclo das colônias das duas espécies é similar. Os pesquisadores demonstraram, por meio de análise morfológica, que o epitélio folicular dos ovários foi desestruturado, com células foliculares organizadas em aglomerados ou ausentes e com cromatina condensada e fragmentada. A morte dessas células pode resultar em morte ou dano para todo folículo, que podem levar complicações para todo o ciclo biológico das colônias de *B. morio*. Os pesquisadores concluíram que a exposição ao cádmio poderia prejudicar gravemente a aptidão dos indivíduos de operárias de *B. morio*. Assim, a utilização do biomarcador mostrou-se eficaz para avaliar os efeitos subletais do cádmio sobre os polinizadores.

2.2.13. Concentrações de Fipronil Estimadas em Campo

Muitos estudos já foram conduzidos para avaliar as concentrações realísticas de agrotóxicos encontradas em campo (Sgolastra *et al.*, 2018). O percentual de amostras contaminadas e o número de agrotóxicos utilizados variam anualmente entre países. A presença de agrotóxicos em produtos como pólen e néctar está associada à quantidade de princípios ativos legalizados em diferentes países (Toselli; Sgolastra, 2020). Em relação ao fipronil, o levantamento bibliográfico demonstrou que, de forma genérica, a variação da concentração em águas doces ocorre na faixa de $5 \times 10^{-4} \mu\text{L L}^{-1}$ a $2 \mu\text{L L}^{-1}$. Em escoamento residual urbano, apresenta uma média de 204×10^{-3} a $44 \times 10^{-2} \mu\text{L L}^{-1}$. Em estações de tratamento de águas residuais as concentrações podem variar de $1,388 \mu\text{L L}^{-1}$ a $31 \times 10^{-3} \mu\text{L L}^{-1}$. Em água potável o fipronil foi ocasionalmente encontrado em uma média de $4 \times 10^{-2} \mu\text{L L}^{-1}$. Em campos irrigados com águas subterrâneas, as concentrações máximas foram encontradas na faixa de $3,44 \mu\text{L L}^{-1}$. A bioacumulação em diversos organismos biológicos foi registrada e as concentrações em tecidos animais são semelhantes às encontradas no ambiente. Dessa forma, embora a exposição inicial de organismos no ambiente não atinja valores de ecotoxicidade, a exposição repetida, tanto em sua forma original quanto aos seus subprodutos, pode levar a sua bioacumulação (Pino-Ortín *et al.*, 2021).

Stoner e Eitzer (2013) realizaram uma revisão sobre estudos relacionados com o predomínio dos principais agrotóxicos encontrados em resíduos como mel e pólen em colmeias de *A. mellifera*. O estudo foi baseado no declínio anuais de populações relatados globalmente. Para avaliar o risco dos agrotóxicos no pólen em relação à toxicidade aguda para abelhas, os pesquisadores determinaram o Quociente de Risco de Pólen (PHQ), baseado na concentração de resíduos de agrotóxicos no pólen/DL₅₀. A fórmula foi usada como padrão para todos os dados de pólen, o que permitiu uma triagem eficiente para riscos causados pelo agrotóxico. Dessa maneira, 70 agrotóxicos foram detectados, incluindo o fipronil. O valor máximo de fipronil encontrados nas amostras pelos pesquisadores foi de $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, valor mínimo de $2,0 \mu\text{L L}^{-1}$, com valor médio de $2,8 \mu\text{L L}^{-1}$.

Diversos trabalhos ecotoxicológicos relacionados com exposições ao fipronil utilizaram as doses mencionadas. O trabalho realizado por Zaluski *et al.* (2017) avaliou a relação de concentrações encontradas em campo de fipronil e piraclostrobina sobre as células de glândulas mandibulares e hipofaríngeas de *A. mellifera*. A concentração de

fipronil utilizada na pesquisa foi de $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$, e os pesquisadores destacaram ser a mais próxima em que os polinizadores são expostos em campo durante a coleta de pólen. A concentração utilizada foi baseada em revisões sobre o fipronil efetuadas pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar – EFSA (EFSA, 2013) e por Bernal *et al.* (2010) para avaliar os resíduos de agrotóxicos no pólen em colônias de *A. mellifera*, devido à observação de declínio populacional dessas abelhas na Espanha. Zaluski *et al.* (2017) concluíram que a exposição ao fipronil causou danos às glândulas mandibulares e hipofaríngeas, prejudicando a digestão e absorção de nutrientes.

Baseados nos trabalhos de Stoner e Eitzer (2013) e Zaluski *et al.* (2017) e em trabalhos que utilizaram biomarcadores para analisar a toxicidade de concentrações subletais de agrotóxicos sobre as abelhas do gênero *Bombus* (Abdalla; Domingues, 2015), a atual pesquisa utilizou biomarcadores de efeito para analisar os efeitos da exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil, atendendo um amplo espectro de variações de doses diluídas para pulverização de culturas agrícolas e encontradas no pólen das amostras de campo. Os trabalhos toxicológicos encontrados na literatura sobre exposição a doses subletais de fipronil em espécies de abelhas utilizaram variações similares às doses utilizadas na atual pesquisa a fim de obter um cenário realístico em relação as exposições observadas em campo. Dessa forma, a atual pesquisa tem como hipótese que a variação das concentrações subletais de fipronil encontradas em campo ($1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$) sejam capazes de causar danos estruturais e metabólicos sobre as células do SHN (trofócitos, enócitos e células pericárdicas) de *B. atratus*.

2.2.14. Objetivos

O atual trabalho realizou um levantamento da problemática da utilização dos agrotóxicos como o fipronil, de forma inadequada e não racionalizada, assim como a forma como concentrações subletais utilizados em sistemas agrícolas podem prejudicar o organismo de espécies de abelhas nativas, principalmente espécies do gênero *Bombus* encontradas em território nacional, como *B. atratus*.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-nephrotoxic system: A novel model of biomarkers for analysis of the ecology of stress in environmental biomonitoring. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132349, 2015.
- ABDALLA, F. C. *et al.* Effect of cadmium on worker ovary morphology of *Bombus morio* (Hymenoptera: Bombini). **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 28-37, 2018.
- ABROL, D. P.; MONDAL, A.; SHANKAR, U. Importance of bumblebees for crop pollination and food security. **Journal of Palynology**, v. 57, p. 9-37, 2021.
- ADAMEYKO, K. I. *et al.* Conservative and atypical ferritins of sponges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8635, 2021.
- AIZEN, M. A. *et al.* Coordinated species importation policies are needed to reduce serious invasions globally: The case of alien bumblebees in South America. **Journal of Applied Ecology**, v. 56, n. 1, p. 100-106, 2019.
- ALTHAUS, S. L. *et al.* No buzz for bees: Media coverage of pollinator decline. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 2, p. e2002552117, 2021.
- AMINI-ESFIDVAJANI, M. *et al.* Effect of nano-particles of zinc oxide and selenium on antioxidant status, aminotransferase enzymes activities and genes expression of sod-1 and vg in honey bee during the hot season. **Journal of Trace Elements and Minerals**, v. 2, p. 100034, 2022.
- AROWOLO, A. O. *et al.* Assessing changes in the value of ecosystem services in response to land-use/land-cover dynamics in Nigeria. **Science of the total Environment**, v. 636, p. 597-609, 2018.
- ASSIS, J. C. *et al.* Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). **Environmental Pollution**, v. 304, p. 119140, 2022.
- ASTOLFI, A. *et al.* Field relevant doses of the fipronil affects gene expression in honey bees *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 53, n. 6, p. 69, 2022.
- AVICOR, S. W. *et al.* Contact toxicity and proximate effect of fipronil on insect pest and predatory ant community structure in cocoa agro-ecosystem. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 14, p. 100909, 2023.
- AZPIAZU, C. *et al.* Description and validation of an improved method to feed solitary bees (*Osmia* spp.) known amounts of pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 264, p. 115398, 2023.
- BAENA-DÍAZ, F. *et al.* *Apis mellifera* in Mexico: honey production, melliferous flora and pollination aspects. Review. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 13, n. 2, p. 525-548, 2022.
- BALLARIN, C. S. *et al.* How many animal-pollinated angiosperms are nectar-producing? **New Phytologist**, v. 243, n. 5, p. 2008-2020, 2024.

BÁLSAMO, P. J. *et al.* Impact of sublethal doses of thiamethoxam and *Nosema ceranae* inoculation on the hepato-nephrocytic system in young Africanized *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 350-361, 2020.

BASF S.A.: Tuit® Florestal: Fipronil. **BASF**. São Paulo, [21 mai. 2024]. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/tuit-florestal>. Acesso em: 15 mai. 2025.

BELSKY, J. E.; CAMP, A. A.; LEHMANN, D. M. The importance of males to bumble bee (*Bombus* species) nest development and colony viability. **Insects**, v. 11, n. 8, p. 506, 2020.

BERNAL, J. *et al.* Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 6, p. 1964-1971, 2010.

BHATT, P. *et al.* Insights into the toxicity and biodegradation of fipronil in contaminated environment. **Microbiological research**, v. 266, p. 127247, 2023.

BLASCO-LAVILLA, N. *et al.* Infection by *Crithidia bombi* increases relative abundance of *Lactobacillus spp.* in the gut of *Bombus terrestris*. **Molecular Ecology**, v. 33, n. 17, p. e17478, 2024.

BLOOMQUIST, J.R. Insecticides: chemistries and characteristics. Flórida: [s.n.], 2015. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/bloomquist-insecticides>>. Acesso em: 18 sep. 2020.

BOEING, G. A. N. S. *et al.* Genotoxic effect of two environmentally safe doses of cadmium on the hepato-nephrocytic system of *Bombus atratus* forager workers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 108, p. 104450, 2024.

BRASIL, L. S. *et al.* Aquatic insects and their environmental predictors: a scientometric study focused on environmental monitoring in lotic environmental. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 3, p. 194, 2020.

BREJCHA, M. *et al.* Seasonal changes in ultrastructure and gene expression in the fat body of worker honey bees. **Journal of insect physiology**, v. 146, p. 104504, 2023.

BUCHHOLZ, S.; EGERER, M. H. Functional ecology of wild bees in cities: towards a better understanding of trait-urbanization relationships. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 9, p. 2779-2801, 2020.

CAMERON, S. A.; SADD, B. M. Global trends in bumble bee health. **Annual review of entomology**, v. 65, n. 1, p. 209-232, 2020.

CARVALHO, F. G. *et al.* Acute fipronil toxicity induces high mortality rate for honeybees and stingless bees, with the latter facing heightened risk. **Apidologie**, v. 55, n. 5, p. 64, 2024.

CASTILHOS, D. *et al.* Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, v. 50, p. 263-272, 2019.

CATANIA, R. *et al.* Are botanical biopesticides safe for bees (Hymenoptera, Apoidea)? **Insects**, v. 14, n. 3, p. 247, 2023.

CCAB Agro S.A. Fipronil CCAB 800 Wg. **CCAB**. São Paulo, [s.d.]. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-05/fipronilccab800wg.pdf. Acesso em: 7 mai. 2025.

CHAITANYA, P. *et al.* Development of smart pesticide spraying robot. **International Journal of Recent Technology and Engineering**, v. 8, n. 5, p. 2193-2202, 2020.

CHOWDHURY, S. *et al.* Insects as bioindicator: A hidden gem for environmental monitoring. **Frontiers in environmental science**, v. 11, 2023.

COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **NRC: Biological markers in environmental health research**, 1987.

CROWTHER, L. P. *et al.* Spatial ecology of a range-expanding bumble bee pollinator. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 3, p. 986-997, 2019.

CUEVA DEL CASTILLO, R. *et al.* On the evolution of body size and of sexual dimorphism in corbiculate bees. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 3, p. 348-363, 2024.

DARRAGH, K.; NELSON, D. R.; RAMÍREZ, S. R. The birth-and-death evolution of cytochrome P450 genes in bees. **Genome biology and evolution**, v. 13, n. 12, p. evab261, 2021.

DECOURTYE, A. *et al.* Decision-making criteria for pesticide spraying considering the bees' presence on crops to reduce their exposure risk. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 1062441, 2023.

DESCAMPS, C. *et al.* Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 493, 2021.

DI FIORE, C. *et al.* Honeybees as bioindicators of heavy metal pollution in urban and rural areas in the South of Italy. **Atmosphere**, v. 13, n. 4, p. 624, 2022.

DOMINGUES, C. E. C. *et al.* Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

EKKA, A. *et al.* Anthropogenic modifications and river ecosystem services: a landscape perspective. **Water**, v. 12, n. 10, p. 2706, 2020.

ELLMAN, B. *et al.* # Buzz: exploring public interest in pollinators, bees, and honey using online media data. **Telematics and Informatics**, v. 82, p. 102000, 2023.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. **EFSA Journal**, v. 11, n. 5, p. 3158, 2013.

EVANS, J. D.; CHEN, Y. Colony collapse disorder and honey bee health. **Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner**, p. 229-234, 2021.

FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 774, p. 145679, 2021.

- FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Fipronil exposure compromises respiration and damages the Malpighian tubules of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 58, p. 88101-88108, 2022.
- FELDHAAAR, H.; OTTI, O. Pollutants and their interaction with diseases of social Hymenoptera. **Insects**, v. 11, n. 3, p. 153, 2020.
- FIJEN, T. P. M. *et al.* Insect pollination is at least as important for marketable crop yield as plant quality in a seed crop. **Ecology letters**, v. 21, n. 11, p. 1704-1713, 2018.
- GÉRARD, M. *et al.* Elevated developmental temperatures impact the size and allometry of morphological traits of the bumblebee *Bombus terrestris*. **Journal of Experimental Biology**, v. 226, n. 8, p. jeb245728, 2023.
- GHISBAIN, G. *et al.* Expanding insect pollinators in the Anthropocene. **Biological Reviews**, v. 96, n. 6, p. 2755-2770, 2021.
- GISDER, S. *et al.* Rapid gastrointestinal passage may protect *Bombus terrestris* from becoming a true host for *Nosema ceranae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 12, p. e00629-20, 2020.
- GRAVES, T. A. *et al.* Western bumble bee: declines in the continental United States and range-wide information gaps. **Ecosphere**, v. 11, n. 6, p. e03141, 2020.
- GRIGORAKI, L. *et al.* Cuticular hydrocarbon biosynthesis in malaria vectors: Insights from the adult oenocyte transcriptome. **bioRxiv**, p. 2020.04. 28.065938, 2020.
- HAAS, J.; NAUEN, R. Pesticide risk assessment at the molecular level using honey bee cytochrome P450 enzymes: A complementary approach. **Environment International**, v. 147, p. 106372, 2021.
- HAAS, J. *et al.* Phylogenomic and functional characterization of an evolutionary conserved cytochrome P450-based insecticide detoxification mechanism in bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 26, p. e2205850119, 2022.
- HAFEEZ, A. *et al.* Implementation of drone technology for farm monitoring & pesticide spraying: A review. **Information processing in Agriculture**, v. 10, n. 2, p. 192-203, 2023.
- HANBERRY, B. B. *et al.* Pollinators of the Great Plains: disturbances, stressors, management, and research needs. **Rangeland Ecology & Management**, v. 78, p. 220-234, 2021.
- HAYWARD, A. *et al.* A cytochrome P450 insecticide detoxification mechanism is not conserved across the Megachilidae family of bees. **Evolutionary Applications**, v. 17, n. 1, p. e13625, 2024.
- HENNIG, T. B. *et al.* A systematic review of the toxic effects of a nanopesticide on non-target organisms: Estimation of protective concentrations using a species sensitivity distribution (SSD) approach—The case of atrazine. **Science of the Total Environment**, v. 871, p. 162094, 2023.
- HERBERTSSON, L. *et al.* Long-term data shows increasing dominance of *Bombus terrestris* with climate warming. **Basic and Applied Ecology**, v. 53, p. 116-123, 2021.

- HOLDER, P. J. *et al.* Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 51, p. 13033-13038, 2018.
- HRISTOV, P. *et al.* Honey bee colony losses: Why are honey bees disappearing? **Sociobiology**, v. 68, n. 1, p. e5851-e5851, 2021.
- HSU, C.; WENG, Y. Long-term inhibition of ferritin synthesis in trophocytes and oenocytes by ferritin double-stranded RNA ingestion to investigate the mechanisms of magnetoreception in honey bees (*Apis mellifera*). **Plos one**, v. 16, n. 8, p. e0256341, 2021.
- IBAMA. [Ibama Suspende Cautelarmente Aplicação de Agrotóxicos à Base de Fipronil]. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/notas/2024/ibama-suspende-cautelarmente-aplicacao-de-agrotoxicos-a-base-de-fipronil>. Acesso em: 14 jan. 2025.
- INOUE, L. V. B. *et al.* Harmful effects of pyraclostrobin on the fat body and pericardial cells of foragers of africanized honey bee. **Toxics**, v. 10, n. 9, p. 530, 2022.
- JANOUSEK, W. M. *et al.* Recent and future declines of a historically widespread pollinator linked to climate, land cover, and pesticides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 5, p. e2211223120, 2023.
- JHA, S. Contemporary human-altered landscapes and oceanic barriers reduce bumble bee gene flow. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 5, p. 993-1006, 2015.
- KAABECHE, M. *et al.* Cardiotoxicity of the diamide insecticide chlorantraniliprole in the intact heart and in isolated cardiomyocytes from the honey bee. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 14938, 2024.
- KAIRO, G. *et al.* Assessment of the toxic effect of pesticides on honey bee drone fertility using laboratory and semifield approaches: A case study of fipronil. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 9, p. 2345-2351, 2017.
- KATUMO, D. M. *et al.* Pollinator diversity benefits natural and agricultural ecosystems, environmental health, and human welfare. **Plant Diversity**, v. 44, n. 5, p. 429-435, 2022.
- KAYA, M. Y.; GÜLTEKIN, Y. S.; GÜLTEKIN, P. Evaluation of Honey Bees within the Scope of Sustainable Development Goals and Ecosystem Services. **Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, v. 11, n. 5, p. 2397-2408. 2023
- KHALIFA, S. A. M. *et al.* Overview of bee pollination and its economic value for crop production. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 688, 2021.
- KHATRI, N.; TYAGI, S.; RAWTANI, D. Rural environment study for water from different sources in cluster of villages in Mehsana district of Gujarat. **Environmental monitoring and assessment**, v. 190, p. 1-20, 2018.
- KLEIN, S. *et al.* Why bees are so vulnerable to environmental stressors. **Trends in ecology & evolution**, v. 32, n. 4, p. 268-278, 2017.
- KOVALSKYI, Y.; ZHMUR, V. Features of fat body development in the body of honey bees. **Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural sciences**, v. 26, n. 100, p. 179-183, 2024.
- KRECHEMER, F. S.; MARCHIORO, C. A.; BUTT, N. Past, present and future distributions of bumblebees in South America: identifying priority species and areas for conservation. **Journal of Applied Ecology**, v. 57, n. 9, 2020.

- LICZNER, A. R. The Conservation Management and Ecology of Northeastern North American Bumble Bees. 2020.
- LIMA, M. A. P. *et al.* Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, p. 733-747, 2016.
- LU, C. *et al.* The trophocytes and oenocytes of worker and queen honey bees (*Apis mellifera*) exhibit distinct age-associated transcriptome profiles. **GeroScience**, v. 43, n. 4, p. 1863-1875, 2021.
- MACINNIS, G.; FORREST, J. R. K. Field design can affect cross-pollination and crop yield in strawberry (*Fragaria x ananassa* D.). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 289, p. 106738, 2020.
- MACKENZIE, E. L.; GOULSON, D.; ROTHERAY, E. L. Investigating the foraging, guarding and drifting behaviors of commercial *Bombus terrestris*. **Journal of insect behavior**, v. 34, n. 5, p. 334-345, 2021.
- MAEBE, K. *et al.* Bumblebee resilience to climate change, through plastic and adaptive responses. **Global change biology**, v. 27, n. 18, p. 4223-4237, 2021.
- MAIN, A. R. *et al.* Beyond neonicotinoids—wild pollinators are exposed to a range of pesticides while foraging in agroecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 742, p. 140436, 2020.
- MARGARITA, O.; OSNAT, M.; ABRAHAM, H. Choosing the best: honeybee workers can assess reproductive quality of the queen through pheromonal signalling in simultaneous choice assays. **Apidologie**, v. 51, p. 291-306, 2020.
- MARGOTTA, J. W.; ROBERTS, S. P.; ELEKONICH, M. M. Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 14, p. jeb183228, 2018.
- MARTELLI, F. *et al.* Worker bees (*Apis mellifera*) deprived of pollen in the first week of adulthood exhibit signs of premature aging. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, p. 103774, 2022.
- MARTIN, C. D. *et al.* Busier bees: increasing nest traffic in commercial bumblebee colonies. **Journal of Pollination Ecology**, v. 25, p. 7-15, 2019.
- MARTINET, B. *et al.* Description of nest architecture and ecological notes on the bumblebee *Bombus (Pyrobombus) lapponicus* (Hymenoptera: Apidae: Bombini). **Insectes Sociaux**, v. 69, n. 1, p. 131-135, 2022.
- MARTINEZ, A.; CALHOUN, A. C.; SADD, B. M. Investigating the influence of diet diversity on infection outcomes in a bumble bee (*Bombus impatiens*) and microsporidian (*Nosema bombi*) host-pathogen system. **Frontiers in Insect Science**, v. 3, p. 1207058, 2023.
- MASIH, S. C. Impact of Monocrotophos pesticide on serum biochemical profile in freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822). 2021.
- MORRIS, Brian. Insects and human life. Routledge, 2020.
- MULLINS, J. L.; STRANGE, J. P.; TRIPODI, A. D. Why are queens broodless? Failed nest initiation not linked to parasites, mating status, or ovary development in two bumble

bee species of *Pyrobombus* (Hymenoptera: Apidae: Bombus). **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 2, p. 575-581, 2020.

MULVEY, J.; CRESSWELL, J. E. Time-dependent effects on bumble bees of dietary exposures to farmland insecticides (imidacloprid, thiamethoxam and fipronil). **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2846-2853, 2020.

NAHARKI, K.; REGMI, S. Risk assessment of pesticidal toxicity and threats on pollinators: A review on honey bee. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, v. 8, n. 12, p. 2556-2561, 2020.

NAUEN, R.; JESCHKE, P. Basic and applied aspects of neonicotinoid insecticides. **Green trends in insect control**, v. 1, p. 132-162, 2011.

NEGRI, I. *et al.* Honey bees (*Apis mellifera*, L.) as active samplers of airborne particulate matter. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132491, 2015.

NICEWICZ, Ł. *et al.* Set of stress biomarkers as a practical tool in the assessment of multistress effect using honeybees from urban and rural areas as a model organism: a pilot study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 9084-9096, 2021.

NOGUEIRA, F. L. A. *et al.* Exposure to mercury at trace concentrations leads to collapse of the hepato-nephrotoxic system in two neotropical species of bumblebee. **Am. J. Agric. Biol. Sci.**, v. 14, p. 1-10, 2019.

NORTOX S.A.: Fipronil Nortox 800 Wg. **NORTOX**. Arapongas, [24 fev. 2024]. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-05/fipronilnortox800wg.pdf. Acesso em: 7 mai. 2025.

OECD (1998a) Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals: honeybees, acute oral toxicity test. Environmental health safety division, Organisation for Economic Co-operation and Development - Number 213. Paris, France. https://www.oecdilibrary.org/environment/test-no-213-honeybeesacute-oral-toxicity-test_9789264070165-em

OECD (1998b) Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals: honeybees, acute contact toxicity test. Environmental health safety division, Organisation for Economic Co-operation and Development - Number 214. Paris, France. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-214-honeybees-acutecontact-toxicity-test_9789264070189-em

OLIVEIRA, M. O. *et al.* Evidence of Nest Reactivation and Perennial Colonies in the Neotropical Bumble Bee *Bombus brevivillus* (Hymenoptera: Apidae: Bombini). **Neotropical Entomology**, v. 51, n. 6, p. 886-893, 2022.

PAOLI, M.; GALIZIA, G. C. Olfactory coding in honeybees. **Cell and Tissue Research**, v. 383, n. 1, p. 35-58, 2021.

PARDO, A.; BORGES, P. A. V. Worldwide importance of insect pollination in apple orchards: A review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 293, p. 106839, 2020.

PARIKH, G.; RAWTANI, D.; KHATRI, N. "Insects As An Indicator For Environmental Pollution". **Environmental claims journal**, v. 33, n. 2, p. 161-181, 2021.

- PASCALL, David J. *et al.* Virus prevalence and genetic diversity across a wild bumblebee community. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 650747, 2021.
- PELLECCHIA, M.; NEGRI, I. Particulate matter collection by honey bees (*Apis mellifera*, L.) near to a cement factory in Italy. **PeerJ**, v. 6, p. e5322, 2018.
- PEREIRA, A. K. S. *et al.* The socio-environmental and human health problems related to the use of pesticides and the use of advanced oxidative processes for their degradation: Brazil. **Water**, v. 15, n. 8, p. 1608, 2023.
- PEROBELLI, J. E. Pesticides and public health: discussing risks in Brazilian agro-industrial growth. **Frontiers in Toxicology**, v. 7, p. 1442801, 2025.
- PINO-OTÍN, M. R. *et al.* Effects of the insecticide fipronil in freshwater model organisms and microbial and periphyton communities. **Science of the Total Environment**, v. 764, p. 142820, 2021.
- PISA, L. *et al.* An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 11749-11797, 2021.
- POLIDORI, C.; FERRARI, A.; RONCHETTI, F. Biology and Behaviour of European Wild Bees. In: **Hidden and Wild: An Integrated Study of European Wild Bees**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2025. p. 49-118.
- PRAKASH, S. Climate change and need of biodiversity conservation: A review. **International Journal of Applied Research**, v. 3, n. 12, p. 554-557, 2017.
- PRAKASH, S. Impact of Climate change on Aquatic Ecosystem and its Biodiversity: An overview. **International Journal of Biological Innovations**, v. 3, n. 2, 2021.
- PRAKASH, S.; VERMA, A. K. Anthropogenic activities and Biodiversity threats. **International Journal of Biological Innovations, IJBI**, v. 4, n. 1, p. 94-103, 2022.
- PRINCEN, S. A. *et al.* Worker dominance and reproduction in the bumblebee *Bombus terrestris*: when does it pay to bare one's mandibles? **Animal behaviour**, v. 166, p. 41-50, 2020.
- PROVASE, M. *et al.* Impact of environmental concentrations of fipronil on DNA integrity and brain structure of *Bombus atratus* bumblebees. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 110, p. 104536, 2024.
- RADER, R. *et al.* Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 1, p. 146-151, 2016.
- REVERTE, F. C. *et al.* Assessment of impacts on ecosystem services provided by geodiversity in highly urbanised areas: A case study of the Taubaté Basin, Brazil. **Environmental Science & Policy**, v. 112, p. 91-106, 2020.
- RIVEROS, A. J.; GRONENBERG, W. The flavonoid rutin protects the bumble bee *Bombus impatiens* against cognitive impairment by imidacloprid and fipronil. **Journal of Experimental Biology**, v. 225, n. 17, p. jeb244526, 2022.
- ROSA, M. E. *et al.* Recent advances on the influence of fipronil on insect behavior. **Current Opinion in Insect Science**, p. 101251, 2024.

RUSSELL, K. A.; MCFREDERICK, Q. S. Elevated temperature may affect nectar microbes, nectar sugars, and bumble bee foraging preference. **Microbial Ecology**, v. 84, n. 2, p. 473-482, 2022.

SALVARREY, S. *et al.* Characteristics of the tomato fruit (*Solanum lycopersicum*) using native bumblebees (*Bombus atratus*) as pollinators in greenhouse. **Agrociencia (Uruguay)**, v. 24, n. 1, 2020.

SALVARREY, S. *et al.* Parasites and RNA viruses in wild and laboratory reared bumble bees *Bombus pauloensis* (Hymenoptera: Apidae) from Uruguay. **PLoS One**, v. 16, n. 4, p. e0249842, 2021.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees—a risk assessment. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological conservation**, v. 232, p. 8-27, 2019.

SANG, H. *et al.* Conservation genomics analysis reveals recent population decline and possible causes in bumblebee *Bombus opulentus*. **Insect Science**, v. 31, n. 5, p. 1631-1644, 2024.

SANNIGRAHI, S. *et al.* Responses of ecosystem services to natural and anthropogenic forcings: A spatial regression based assessment in the world's largest mangrove ecosystem. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 137004, 2020.

SANTOS, C. F.; OTESBELGUE, A.; BLOCHTEIN, B. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0200286, 2018.

SCACCABAROZZI, D. *et al.* Evidence of introduced honeybees (*Apis mellifera*) as pollen wasters in orchid pollination. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 14076, 2024.

SCHEPER, J. *et al.* Biodiversity and pollination benefits trade off against profit in an intensive farming system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 28, p. e2212124120, 2023.

SINGH, N. S. *et al.* A comprehensive review of environmental fate and degradation of fipronil and its toxic metabolites. **Environmental Research**, v. 199, p. 111316, 2021.

SIVITER, H.; BROWN, M. J. F.; LEADBEATER, E. Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. **Nature**, v. 561, n. 7721, p. 109-112, 2018.

SGOLASTRA, F. *et al.* Combined exposure to sublethal concentrations of an insecticide and a fungicide affect feeding, ovary development and longevity in a solitary bee. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 285, n. 1885, p. 20180887, 2018.

SGOLASTRA, F. *et al.* Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, v. 241, p. 108356, 2020.

SONIKA, Y. A. H.; Kumar, R. A study on evaluation of environmental effect on honey bee species in Western Himalayan region. **J. Entomol. Res**, 45, 802–806, 2021

STEC, N.; SALEEM, A.; DARVEAU, C. Proline as a Sparkler Metabolite of Oxidative Metabolism during the Flight of the Bumblebee, *Bombus impatiens*. **Metabolites**, v. 11, n. 8, p. 511, 2021.

- STEPHENS, R. E. *et al.* Insect pollination for most of angiosperm evolutionary history. **New Phytologist**, v. 240, n. 2, p. 880-891, 2023.
- STONER, K. A.; EITZER, B. D. Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77550, 2013.
- SKOWRONEK, P.; WÓJCIK, Ł.; STRACHECKA, A. Fat body—Multifunctional insect tissue. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 547, 2021.
- SUKUMARAN, A.; KHANDURI, V. P.; SHARMA, C. M. Pollinator-mediated self-pollination and reproductive assurance in an isolated tree of *Magnolia grandiflora* L. **Ecological Processes**, v. 9, p. 1-9, 2020.
- SYAFRUDIN, M. *et al.* Pesticides in drinking water—a review. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 2, p. 468, 2021.
- SZCZEPANKIEWICZ, A.; SIMICZYJEW, B. Ovary structure and oogenesis in Heteroptera. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 68, n. 3, p. 83-92, 2024.
- TAYE, R. R. *et al.* Molecular Characterization of Bumble Bees Species from North East Himalayas. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 9, n. 5, p. 2010-2016, 2020.
- TIMERMAN, D.; BARRETT, S. C. H. The biomechanics of pollen release: new perspectives on the evolution of wind pollination in angiosperms. **Biological Reviews**, v. 96, n. 5, p. 2146-2163, 2021.
- TOLEDO-HERNÁNDEZ, E. *et al.* The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. **Apidologie**, v. 53, n. 1, p. 8, 2022.
- TOMLIN, Clive DS. **The pesticide manual: a world compendium**. 2009.
- TOSELLI, G.; SGOLASTRA, F. Seek and you shall find: An assessment of the influence of the analytical methodologies on pesticide occurrences in honey bee-collected pollen with a systematic review. **Chemosphere**, v. 258, p. 127358, 2020.
- TUDI, M. *et al.* Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.
- VERMA, O. Climate change and its impacts with special reference to India. In: **Water, Cryosphere, and Climate Change in the Himalayas: A Geospatial Approach**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 39-55.
- VIKRAM, P. R. K. R. Agricultural Robot—A pesticide spraying device. **International Journal of Future Generation Communication and Networking**, v. 13, n. 1, p. 150-160, 2020.
- VOUMIK, L. C.; MIMI, M. B.; RAIHAN, A. Nexus between urbanization, industrialization, natural resources rent, and anthropogenic carbon emissions in South Asia: CS-ARDL approach. **Anthropocene Science**, v. 2, n. 1, p. 48-61, 2023.
- WAKGARI, M.; YIGEZU, G. Honeybee keeping constraints and future prospects. **Cogent Food & Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 1872192, 2021.

WAGNER, D. L. Insect declines in the Anthropocene. **Annual review of entomology**, v. 65, n. 1, p. 457-480, 2020.

WILLIAMS, P. H.; JEPSEN, S. IUCN Bumblebee Specialist Group Annual Report 2020. **London: National History Museum**, 2021.

WINFREE, Rachael *et al.* Species turnover promotes the importance of bee diversity for crop pollination at regional scales. **Science**, v. 359, n. 6377, p. 791-793, 2018.

XU, X. *et al.* Ecosystem services trade-offs and determinants in China's Yangtze River Economic Belt from 2000 to 2015. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 1601-1614, 2018.

XU, Y. *et al.* Vibration mechanics involved in buzz pollination lead to size-dependent associations between bumblebees and Pedicularis flowers. **Science China Life Sciences**, p. 1-12, 2025.

XUN, L. *et al.* Advanced spraying systems to improve pesticide saving and reduce spray drift for apple orchards. **Precision Agriculture**, v. 24, n. 4, p. 1526-1546, 2023.

YAN, S. *et al.* Simple osthole/nanocarrier pesticide efficiently controls both pests and diseases fulfilling the need of green production of strawberry. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 30, p. 36350-36360, 2021.

YANKIT, P. *et al.* Effect of bumble bee pollination on quality and yield of tomato (*Solanum lycopersicum Mill.*) grown under protected conditions. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 257-263, 2018.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN J. R, L. A.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15217, 2017.

ZANIN, A. R. A. *et al.* Reduction of pesticide application via real-time precision spraying. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 5638, 2022.

ZAVODSKA, R.; SEHADOVA, H. The rate of DNA synthesis in ovaries, fat body cells, and pericardial cells of the bumblebee (*Bombus terrestris*) depends on the stage of ovarian maturation. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1034584, 2023.

3. CAPÍTULO 2 – MÚLTIPLOS BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS SUBLETAIS DO FIPRONIL SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA HEPATONEFROCÍTICO

RESUMO

O fipronil causa efeitos toxicológicos para o organismo das abelhas nativas. Assim, a atual pesquisa avaliou os efeitos de concentrações subletais do fipronil sobre as células do SHN de operárias de *B. atratus*, por meio das análises de múltiplos biomarcadores. Dessa forma, 232 indivíduos de *B. atratus* foram coletados, permanecendo em laboratório a 26°C e 70% de umidade relativa, durante 96 horas. Para o grupo controle foi fornecido solução de sacarose (70%) como alimento e 2mL de água mineral. Aos grupos experimentais, alimento e exposições a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Os resultados da análise morfológica indicaram danos celulares de trofócitos e enócitos, enquanto as células pericárdicas apresentaram estágios II e III de ativação. A morfometria indicou diminuição da área de trofócitos e enócitos expostos a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$), enquanto as células pericárdicas apresentaram aumento área celular em todas as exposições analisadas ($P < 0,0001$). A análise genotóxica indicou que o fipronil causou danos mais intensos ao material genético para as exposições a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$). A análise histoquímica de fluorescência indicou fragmentação da cromatina para as mesmas concentrações. As análises histoquímicas indicaram que não ocorreu variação dos conteúdos de glicogênio e triglicerídeos, enquanto o conteúdo de proteínas diminuiu em trofócitos e células pericárdicas. A pesquisa concluiu que as concentrações subletais de fipronil encontradas em campo apresentaram potencial para prejudicar o organismo de forrageias de *B. atratus*.

Palavras-chave: agrotóxicos; toxicologia; trofócitos; enócitos; células pericárdicas.

ABSTRACT

Fipronil causes toxicological effects on native bees. Therefore, the current study evaluated the effects of sublethal concentrations of fipronil on the SHN cells of *B. atratus* workers through multiple biomarker analyses. Thus, 232 *B. atratus* individuals were collected and kept in the laboratory at 26°C and 70% relative humidity for 96 hours. The control group was provided with a 70% sucrose solution and 2 mL of mineral water. The experimental groups received food and were exposed to 1.5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2.5 $\mu\text{L L}^{-1}$, and 3.5 $\mu\text{L L}^{-1}$ of fipronil. The results of the morphological analysis indicated cellular damage to trophocytes and oenocytes, while pericardial cells showed stages II and III of activation. Morphometry indicated a decrease in the area of trophocytes and oenocytes exposed to 2.5 $\mu\text{L L}^{-1}$ and 3.5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0.0001$), while pericardial cells showed an increase in cell area at all exposures analyzed ($P < 0.0001$). Genotoxic analysis indicated that fipronil caused more intense damage to genetic material at 2.5 $\mu\text{L L}^{-1}$ and 3.5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0.0001$). Fluorescence histochemical analysis indicated chromatin fragmentation at the same concentrations. Histochemical analyses indicated no variation in glycogen and triglyceride contents, while protein content decreased in trophocytes and pericardial cells. The study concluded that sublethal concentrations of fipronil found in the field had the potential to harm the foraging organism of *B. atratus*.

Keywords: pesticides; toxicology; trophocytes; oenocytes; pericardial cells.

3.1. INTRODUÇÃO

A atual pesquisa utilizará múltiplos biomarcadores para analisar os danos celulares causados pelo fipronil sobre as células do SHN de *B. atratus*: análise morfológica, morfométrica, genotóxica, histoquímica de fluorescência e histoquímicas. As células do SHN são a primeira linha de barreira contra substâncias tóxicas com capacidade para prejudicar o organismo dos insetos (Abdalla; Domingues, 2015). A importância da análise das células do SHN envolvendo a exposição de agrotóxicos foi inicialmente abordado por Abdalla e Domingues (2015) e representa um marco para pesquisas ecotoxicológicas. Os pesquisadores atribuíram a análise das células do SHN como uma ferramenta chave para avaliar a toxicidade de agrotóxicos, visto que as células desempenham funções metabólicas e de neutralização de substâncias, de forma imprescindível para manutenção da homeostase dos insetos. As análises dos biomarcadores apontarão conclusões inéditas sobre o efeito de doses subletais do fipronil sobre o organismo das abelhas forrageiras de *B. atratus*. Desta forma, a análise morfológica revelará os danos em estruturas celulares causados pela ação do fipronil, a análise morfométrica revelará a variação da área superficial celular, as análises genotóxica e histoquímica de fluorescência avaliarão os danos causados sobre o material genético das células do SHN, as análises histoquímicas avaliarão, por fim, as alterações metabólicas por meio da análise dos conteúdos de glicogênio, proteínas e triglicerídeos.

Caso os efeitos das concentrações subletais de fipronil encontradas em campo forem prejudiciais para as células do SHN de *B. atratus*, ficará demonstrado que a aptidão das abelhas poderá ser prejudicada, assim como a polinização das plantas. Os resultados e conclusão da pesquisa poderão ser utilizados para formulação de novas diretrizes a fim de conservar as espécies de *Bombus* nas Américas. É importante ressaltar que a grande parte das publicações científicas sobre o efeito subletais de agrotóxicos sobre os órgãos internos de abelhas nativas do gênero *Bombus* é realizada pelo Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LaBEF) da UFSCar, *campus* Sorocaba. A conservação dessas abelhas sempre foi o objetivo dos trabalhos realizados pelo laboratório.

3.2. REVISÃO DA LITERATURA

3.2.1. Análises Morfológica e Morfométrica

A análise morfológica e morfométrica são ferramentas fundamentais para avaliar os danos celulares e histológicos causados pela ação das doses subletais de agrotóxicos. O princípio da análise morfológica será diferenciar estruturas celulares basófilas coradas pela hematoxilina e estruturas celulares acidófilas coradas pela eosina. A técnica de coloração HE é muito comum em pesquisas histológicas e muito eficaz para a compreensão dos danos celulares causados pela ação de substâncias químicas. De forma complementar, a análise morfométrica também será realizada com as lâminas coradas com HE para realização da análise das áreas celulares. Caso os agrotóxicos causem alterações na área das células analisadas, em decorrência de injúrias em estruturas celulares, a medição das áreas realizada pela análise morfométrica identificará essa a variação de forma estatística.

3.2.2. Análise Genotóxica

Os danos genotóxicos causados pelos efeitos subletais de agrotóxicos podem resultar em anomalias congênitas, carcinogênese e disfunções reprodutivas no organismo das abelhas, prejudicando a integridade e o ciclo celular ao comprometer os processos de transcrição e tradução essenciais para manutenção das atividades celulares (Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020; Boeing *et al.*, 2024). Em contrapartida, existem mecanismos celulares de reparo aos danos genotóxicos que restabelecem as capacidades fisiológicas no organismo das abelhas (Wallig; Janovitz, 2022). No entanto, a capacidade de resiliência das células pode ser ineficaz em relação a toxicidade do agrotóxico. Diversos grupos biológicos demonstraram efeitos genotóxicos do fipronil causados pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que induziram danos estruturais na molécula de DNA (Provase *et al.*, 2024). Assim, a pesquisa realizará a análise dos efeitos genotóxicos do fipronil sobre as células do SHN para evidenciar o quadro toxicológico do fipronil em *B. atratus*. A atual pesquisa realizará análise genotóxica por meio do Ensaio Cometa, técnica adequada para estudos em diversos grupos biológicos, incluindo anfíbios, moluscos, anelídeos, insetos e plantas (Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020).

O Ensaio Cometa foi inicialmente descrito por Östling e Johanson (1984) como técnica para avaliar e quantificar os danos ao DNA resultantes da ação de espécies

reativas de oxigênio (ROS). A técnica apresenta aplicações em testes de genotoxicidade, adequado para uso em experimentos com animais (Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020). A técnica também fornecerá informações sobre a conformação do material genético após a exposição a substâncias genotóxicas. O Ensaio Cometa é conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE) (Gastelbondo-Pastrana *et al.*, 2019). A técnica apresenta vantagens como baixo custo, necessidade de pequena quantidade de amostra e precisão na avaliação de efeitos genotóxicos de substâncias como os agrotóxicos (Afanasieva; Sivolob, 2018). A aplicação do Ensaio Cometa é relativamente rápida, mas apresenta alguns estágios para realizar o preparo das amostras. Portanto, sua simplicidade é enganosa, pois é preciso ter cuidado com os detalhes práticos da técnica. Após a conclusão das etapas do preparo, permanecerá apenas o nucleoide, a matriz nuclear composta pela cromatina sem as proteínas histonas. As otimizações dos protocolos ao longo do tempo tornaram o Ensaio Cometa uma técnica adequada para diversos grupos biológicos (Gastelbondo-Pastrana *et al.*, 2019; Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020; Boeing *et al.*, 2024). Em insetos, a técnica foi inicialmente aplicada em estudos com *Drosophila melanogaster* e mais tarde, passou a ser utilizada em outros grupos, como as abelhas (Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020). A importância da aplicação do Ensaio Cometa neste estudo consistirá em avaliar os danos sobre a molécula de DNA das células do SHN, uma vez que os efeitos do fipronil possibilitam o surgimento de mutações cromossômicas, colocando em risco a sobrevivência e aptidão dos organismos expostos.

O DNA é encontrado de forma superenovelado como consequência das espirais da dupla hélice da molécula ao redor das proteínas histonas no núcleo celular (Pinto *et al.*, 2024). O Ensaio Cometa consiste na incorporação de amostras celulares em gel de agarose, seguido de tratamento com solução de lise para remoção das membranas plasmáticas e proteínas. Assim, somente os nucleoides são incorporados ao gel, ou seja, a cromatina nuclear sem a carioteca e as proteínas histonas. Em seguida, as lâminas com os nucleoides são submetidas a tratamento alcalino e eletroforese, que possibilita a migração da molécula de DNA em direção ao ânodo da placa de eletroforese (Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020; Boeing *et al.*, 2024). Apesar das proteínas histonas serem removidas, o superenrolamento permanece, formando “loops” de DNA no gel de agarose. Uma ruptura da fita causada pela ação de substâncias tóxicas distende o superenrolamento e os “loops” quebrados se estendem em direção ao ânodo da placa durante a eletroforese, formando uma “cauda” quando a lâmina é submetida a eletroforese alcalina. O material

genético é atraído somente se houver danos estruturais na molécula (Collins, 2014; Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020). A cauda formada pode ser visualizada por microscopia de fluorescência após a aplicação de um fluoróforo que se liga ao DNA, como o 4',6-diamidino-2-fenilindol, o DAPI. Portanto, a fluorescência é dependente da estrutura de fita dupla da molécula de DNA (Collins, 2004) e o Ensaio Cometa é baseado na capacidade de distender o superenrolamento da molécula (Ueda, 2020). Quanto maior o efeito genotóxico do agrotóxico sobre o material genético, mais loops serão formados, e mais proeminente será a cauda do cometa visualizada posteriormente (Collins, 2004; Ueda, 2020). As imagens resultantes passam a ser denominadas “cometas”. O material genético sem danos estruturais não apresenta cauda no gel de agarose (Ueda, 2020; Collins *et al.*, 2023; Provase *et al.*, 2024).

A análise do Ensaio Cometa também permitirá identificar e classificar o tamanho das caudas dos cometas em níveis de danos, divididos em cinco categorias (Collins, 2004). Os cometas classificados em nível 0 apresentarão DNA íntegro por apresentarem nucleoides sem cauda, enquanto os níveis 1 a 3 corresponderão aos cometas com intensidades de danos maiores e o nível 4 corresponderá ao maior nível de dano na estrutura do DNA (Gunasekarana; Raj; Chand, 2015; Cesqui-Bertoli *et al.*, 2020). A etapa de classificação dos níveis de danos será realizada sem distinção dos grupos celulares (trofócitos, enócitos e células pericárdicas). Os nucleoides marcados pelo DAPI dos três grupos celulares estarão presentes e distribuídos de forma aleatória nas fotomicrografias, de forma que não ocorrerá a identificação de um grupo celular específico para realizar a classificação dos níveis de dano. Assim, a classificação ocorrerá com os nucleoides dos três grupos celulares. Após a classificação dos níveis de danos do grupo controle e expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil, será realizado o cálculo dos parâmetros quantitativos (índice de dano, dano total e frequência de dano), enquanto a análise estatística dos resultados será realizada por meio dos dados do dano total. Os resultados obtidos fornecerão compreensão sobre os efeitos genotóxicos das doses do fipronil avaliadas na pesquisa sobre as células do SHN.

3.2.3. Análise Histoquímica de Fluorescência

A análise histoquímica de fluorescência será realizada por meio da técnica de coloração Acridine Orange (AO). A análise genotóxica será importante para compreensão dos danos ao material genético causado pela exposição a agentes tóxicos. Outro teste de genotoxicidade a ser efetuado para complementar os resultados obtidos pelo Ensaio Cometa será a realização da análise histoquímica de fluorescência por meio do corante fluorescente AO. O AO é uma técnica rápida e de baixo custo para analisar o metabolismo de ácidos nucleicos (Ribble *et al.*, 2005) e representa uma importante ferramenta para esclarecer os efeitos genotóxicos causados pela exposição de substâncias tóxicas sobre o material genético. Dessa forma, caso ocorram danos estruturais sobre DNA, causando fragmentação da dupla fita helicoidal molecular, fragmentos com fita simples serão formados. Estes poderão ser marcados e identificados por meio do AO (Byvaltsev *et al.*, 2019).

O AO é um membro da classe dos xantenos, corantes orgânicos catiônicos, caracterizados por uma fluorescência brilhante, com estrutura molecular aromática (Byvaltsev *et al.*, 2019; Aliyeva; Azizkhanli, 2023). Os primeiros corantes que envolveram essa classe foram extraídos do alcatrão no século XIX e utilizados por determinado tempo na indústria têxtil e mais tarde, em estudos científicos. Até o período da Primeira Grande Guerra Mundial, os corantes acridines também foram utilizados como antimicrobianos, período antecessor à penicilina (Wainwright, 2001). Os corantes fluorescentes, ou fluoróforos, como o AO, são capazes de formar complexos ou conjugados por meio de ligações com moléculas de ácidos nucleicos, sendo frequentemente utilizados em estudos celulares e histológicos (Kulyk *et al.*, 2022). A aplicação de AO em pesquisas biológicas iniciou-se em exames clínicos para identificação de bactérias (Byvaltsev *et al.*, 2019). Por sua característica fotodinâmica sobre as moléculas de ácidos nucleicos, atualmente o AO também é utilizado em pesquisas toxicológicas e em experimentos ópticos (Kostjukova, 2021; Kulyk *et al.*, 2022), devido à sua propriedade em estabelecer ligações químicas com diversas moléculas orgânicas (Kostjukova, 2021).

A característica fundamental do AO e base de sua utilização em estudos histológicos como sonda óptica é o metacromismo (Darzynkiewicz, 1990). As moléculas do AO apresentam emissão de fluorescência na faixa de 514 nm. Ao estabelecerem ligações com moléculas da dupla hélice de DNA, as moléculas do AO alteram a emissão

de sua fluorescência para 530 nm, fazendo com que o DNA apresente fluorescência na cor verde ou amarela (Collins, 2004; Byvaltsev *et al.*, 2019). O mesmo ocorre ao estabelecer ligações com as moléculas de fita simples de RNA, em que sua fluorescência é alterada para até 640 nm, resultando em emissão de fluorescência na cor laranja ou vermelha quando visualizado no microscópio óptico de fluorescência (Collins, 2004; Byvaltsev *et al.*, 2019). Assim, a absorção e emissão máxima de fluorescência depende de moléculas associadas ao AO (Kusuzaki *et al.*, 2014). Células marcadas pelo AO normalmente apresentam núcleos verdes, pela associação com moléculas de DNA, e citoplasma levemente laranja, pela associação com moléculas de RNA (processo de tradução do código genético). A ação genotóxica de agrotóxicos pode causar rupturas nas moléculas de DNA, que passam a apresentar fitas simples, semelhantes ao RNA. Ao serem marcadas pelo AO, as moléculas de DNA podem emitir fluorescência na cor vermelha, indicativo de danos estruturais sobre o material genético (Darzynkiewicz, 1990; Byvaltsev *et al.*, 2019).

3.2.4. Análises Histoquímicas

As análises histoquímicas serão realizadas por meio das técnicas PAS, Azul de Bromofenol e Sudan Black.

I) Azul de Bromofenol - detecção de proteínas totais (Pearse, 1960);

II) PAS (Ácido Periódico e Reativo de Schiff) - detecção de glicoconjugados neutros (Mcmanus, 1946);

III) Sudan Black - detecção de lipídios (Lison, 1934).

A homeostase metabólica é essencial para a vida em todos os organismos biológicos por meio de reações anabólicas e catabólicas. No organismo dos insetos, os conteúdos energéticos são armazenados principalmente na forma de glicogênio, triglicerídeos e proteínas, que atuarão para suprir a demanda energética destes animais. O equilíbrio entre armazenamento e liberação de energia é essencial para a sobrevivência do organismo e é regulado em resposta à disponibilidade e demanda energética (Scofield; Amdam, 2024). Quando a energia é abundante nas células, ocorre o armazenamento na forma de glicogênio e triglicerídeos, utilizados em atividades que demandam gasto energético, como o forrageio. Em situações de escassez de alimento, à medida que o

conteúdo de glicose e de lipídios são utilizados e diminuem, conteúdos proteicos podem ser utilizados para síntese de glicose via gliconeogênese (Renne; Hariri, 2021; Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). Como essas três classes moleculares são observadas nas células do corpo gorduroso e nas células pericárdicas dos insetos, a ação do fipronil poderia prejudicar o armazenamento ou a disponibilidade destes recursos energéticos para o organismo das abelhas. Assim, a atual pesquisa realizou a análise histoquímica das células do SHN para avaliar o conteúdo citoplasmático de glicogênio por meio da técnica de coloração PAS; proteínas, por meio da técnica Azul de Bromofenol; e triglicerídeos, por meio da técnica Sudan Black

A conversão de glicose em glicogênio é realizada para acumular suprimentos para sobrevivência das abelhas em situações que necessitam de gastos energéticos, como a atividade de voo (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). O glicogênio é armazenado no tecido muscular e no corpo gorduroso dos insetos (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021) e rapidamente convertido em glicose para atender às demandas energéticas das abelhas (Ralton *et al.*, 2021). A glicose também pode ser utilizada para sintetizar polissacarídeos que são utilizados para formar a quitina do exoesqueleto desses animais (Lockey, 1988).

Proteínas e aminoácidos desempenham funções essenciais para o organismo biológicos como componentes de estruturas celulares, como fonte de energia das células, e para a síntese de enzimas, hormônios, neurotransmissores, entre outros grupos moleculares fundamentais para manutenção das atividades metabólicas do organismo (Liu *et al.*, 2020). O metabolismo de proteínas é controlado pelos hormônios 20-Hidroxicdisona (20E) e pelo Hormônio Juvenil (JH), os mesmos que regulam a metamorfose dos insetos. Portanto, as reservas proteicas geralmente são utilizadas durante a metamorfose, quando os insetos mais utilizam recursos energéticos estocados em suas células, principalmente no último estágio larval antes da metamorfose (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). A reserva celular de proteínas também contribui para sobrevivência dos insetos em períodos de escassez de alimentos (Oliveira; Cruz-Landim, 2003). Os aminoácidos podem ser utilizados em processos da via gliconeogênica, ou seja, na produção glicose a partir de substratos que não são carboidratos. O processo é de grande importância em situações de demanda energética prolongada ou em situações de baixa disponibilidade de glicogênio ou triglicerídeos (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021).

Os lipídios são as moléculas mais abundantes estocadas no corpo gorduroso, sendo que mais de 90% estão na forma de triglicerídeos. Em condições de estresse energético, os lipídios também são utilizados para atender às necessidades energéticas do organismo das abelhas (Scofield; Amdam, 2024). Essas moléculas são sintetizadas a partir da metabolização de carboidratos e proteínas ou obtidas por meio da alimentação (Brejcha *et al.*, 2023). Quando os triglicerídeos estocados nas células são utilizados para atender as demandas energéticas do organismo dos insetos, ocorre sua liberação para hemolinfa na forma de diacilglicerol e o transporte para os tecidos por meio de lipoforinas, proteínas presentes em insetos e responsáveis pelo transporte de lipídios na hemolinfa (Kovalskyi; Zhmur, 2024). O diacilglicerol é então hidrolisado em ácidos graxos utilizados para o fornecimento de energia (Arrese; Soulages, 2010) e também estão envolvidos como precursores para a síntese de eicosanoides, feromônios, fosfolipídios e cera (Heier; Kühnlein, 2018).

3.2.5. Objetivos

A pesquisa tem como hipótese que as concentrações subletais de fipronil encontradas em campo possam causar danos sobre as células do SHN de *B. atratus*, o que poderia afetar o organismo e a aptidão das abelhas. A pesquisa teve como objetivo analisar os efeitos subletais do fipronil em concentrações estimadas em campo, que variam de 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, sobre as células do SHN de operárias campeiras de *B. atratus*. Assim, a atual pesquisa realizará a análise das células do SHN por meio da utilização de múltiplos biomarcadores de efeito, como análise morfológica, morfométrica, genotóxica, histoquímica de fluorescência e histoquímicas, de trofócitos, enócitos e células pericárdicas de *B. atratus*.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Delineamento Experimental

3.3.1.1. Local de Coleta

A coleta das abelhas ocorreu no *campus* da Universidade Federal de São Carlos, pois o entorno da área é caracterizado pela presença de sistemas agrícolas e as colônias de *B. atratus* encontravam-se em fragmentos de mata entre os sistemas agrícolas (Fig. 9). As abelhas do gênero *Bombus* são capazes de realizar forrageio em áreas de aproximadamente 8 km de distância da colônia (Crowther *et al.*, 2019). Portanto, os indivíduos coletados eram capazes de deslocarem-se até as áreas do entorno ao *campus* da universidade, que apresenta áreas com cultivo de milho e pecuária. Assim, a pesquisa também pode avaliar se as abelhas do local de coleta eram expostas aos agrotóxicos nas áreas do entorno, uma vez que as células do grupo controle poderiam apresentar algum indício de dano celular.

Figura 9 – Local de Coleta e Entorno

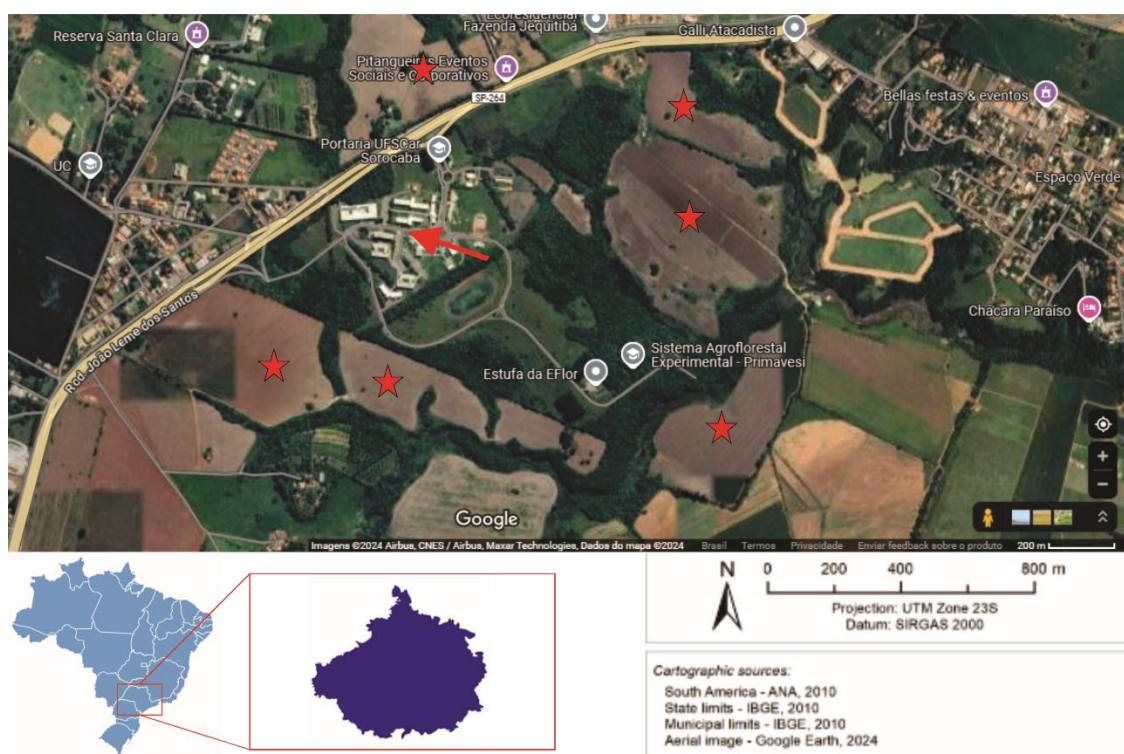


Figura 9 - Local de Coleta e Área de Entorno. A seta representa o local de coleta na Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba. Os asteriscos indicam as áreas agrícolas e criação de gado do entorno. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.3.1.2. Coleta das Abelhas

Os indivíduos da espécie *B. atratus* foram coletados nos fragmentos de Mata Atlântica e Cerrado, nos meses de janeiro, fevereiro e março, na área que compreende o *campus* de Sorocaba (SP) da UFSCar (23°34'53.1"S 47°31'29.5"W), nos períodos entre 2021 a 2024. Foram coletados 232 indivíduos de *B. atratus*. As operárias que realizavam forrageio foram coletadas por meio de rede entomológica, transferidas para tubos Falcon (50 mL), e colocadas em uma caixa térmica, para depois serem transportadas e mantidas em laboratório com temperatura de 25°C.

No Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LaBEF), UFSCar, *campus* Sorocaba (SP), as abelhas foram mantidas isoladas em caixas entomológicas de madeira (16x12x10 cm), em estufa B.O.D., a 26°C e umidade relativa de 70%, no escuro (OECD, 2017b), seguindo os protocolos preestabelecidos por Abdalla *et al.* (2018), Provase *et al.*, (2021) e Boeing *et al.* (2024).

3.3.1.3. Exposição ao Fipronil

A pesquisa analisou os efeitos de 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil, concentrações encontradas em campo, para avaliar os efeitos toxicológicos do agrotóxico sobre *B. atratus*. Os trabalhos encontrados na literatura sobre exposição a doses subletais de fipronil em espécies de abelhas utilizaram concentrações similares as da atual pesquisa (Stoner; Eitzer, 2013; Zaluski *et al.*, 2017) (Fig. 10). A pesquisa foi realizada com indivíduos de diferentes idades para aproximar as exposições realizadas em laboratório com o cenário realístico das abelhas forrageiras expostas em campo, como ocorre no ambiente natural. Para evitar a coleta excessiva de abelhas, o n amostral foi mantido dentro dos valores mínimos estatisticamente sugeridos (Abdalla; Domingues, 2015; Domingues *et al.*, 2017), pois Cameron *et al.* (2011) relataram declínio de populações das abelhas do gênero *Bombus* no continente americano.

Os bioensaios realizados foram adaptados das diretrizes da OECD número 247 para testar produtos químicos em *B. terrestris* (OECD, 2017b). As caixas entomológicas em que as abelhas permaneceram apresentavam dois alimentadores (3 × 3 × 1,5 cm) (Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil - BR 102023003178-1 A2), de forma que para o controle foi ofertado alimento com solução de sacarose e água mineral e aos grupos expostos alimento com solução de sacarose e solução de fipronil. O fipronil

(C₁₂H₄Cl₂F₆N₄OS, CAS 120068-37-3) foi adquirido da Cymit Chemical S.L., com pureza mínima de 97,0% e massa molar de 437,14 g/mol. As caixas foram higienizadas diariamente com o auxílio de pinça com algodão embebido com hipoclorito de sódio 0,01%, e as reposição da água, solução de fipronil e solução de sacarose 70% também eram higienizadas e repostas diariamente. As abelhas foram divididas em grupo controle e grupos expostos, sendo que dentre os expostos houve outra subdivisão para as exposições a 1,5 µL L⁻¹, 2,5 µL L⁻¹, e 3,5 µL L⁻¹ de fipronil. Ao grupo controle (n = 58) foram fornecidos solução de sacarose 70% e 2 mL de água mineral; aos grupos expostos (n = 174), solução de sacarose 70%, e 2 mL de solução contendo fipronil. As abelhas foram mantidas nos bioensaios durante 96 horas e o volume de 2 mL ofertado foi baseado em trabalhos anteriores realizados no LaBEF sobre o consumo diário das abelhas (OECD, 2017a; OECD, 2017b; Ceschi-Bertolli *et al.*, 2020) (Fig. 10).

Figura 10 - Bioensaios

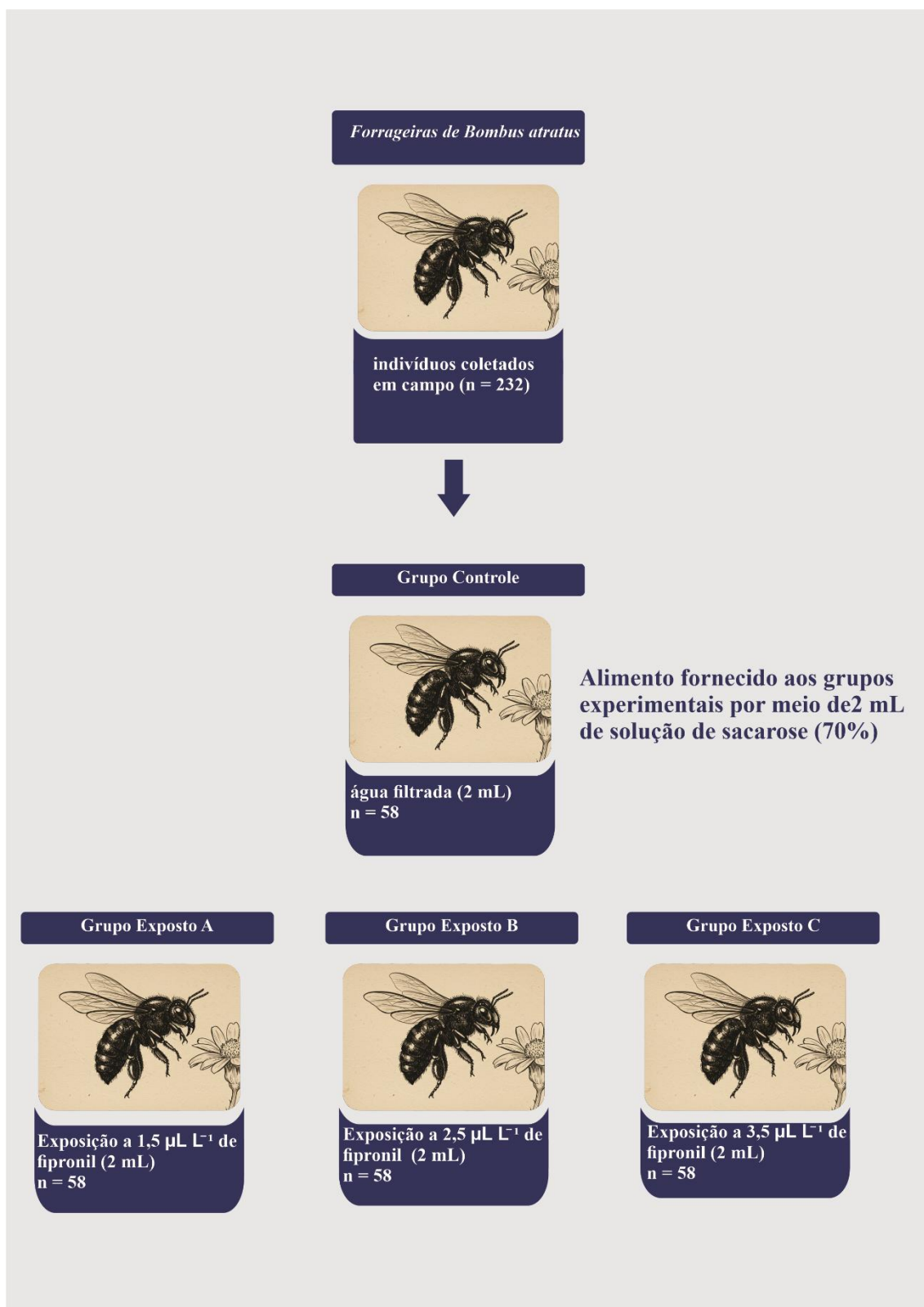


Figura 10 – Bioensaio. Controle e grupos experimentais foram alimentados por meio de 2 mL de solução de sacarose (70%). Controle foi fornecido somente 2 mL de água mineral e os grupos experimentais foram expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ou 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.3.1.4. Dissecção do Vaso Dorsal

Inicialmente as abelhas foram crioanestesiadas a 4°C por 5 minutos (Tutun; Sevin; Çetintav, 2020) e seus vasos dorsais dissecados por meio de microtesouras retas e pinças entomológicas sob um estereomicroscópio (Zeiss Stemi DV4). A dissecção foi realizada em placa de Petri, com os órgãos imersos em água destilada, seguindo as diretrizes da OCDE (OECD, 2017a) para *B. terrestris*. Com o auxílio de estereomicroscópio (Leica EZ4HD), os abdômens foram dissecados, os órgãos internos removidos por meio de uma secção longitudinal na cutícula do lado ventral e o vaso dorsal foi coletado (Fig. 11). Em seguida, os vasos dorsais foram colocados individualmente em microtubos tipo Eppendorf (1,5 mL) contendo solução fixadora tamponada (paraformaldeído 4% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4), devidamente separados e etiquetados. Após 24 horas, o material foi lavado duas vezes em solução tampão de fosfato de sódio (PBS) 0,1 M por 30 minutos.

Figura 11 – Vaso Dorsal



Figura 11 – Vaso Dorsal. Dissecção do vaso dorsal. (*) Legenda: seta: vaso dorsal. Fonte: elaborada pelo próprio autor

3.3.2. Análise Morfológica – Hematoxilina e Eosina

3.3.2.1. Preparo do Material e Emblocamento em Histoiresina

A análise morfológica foi realizada com $n = 3$ para cada tratamento (grupos experimentais e controle). Inicialmente o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool, 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% por 10 minutos cada banho, sendo a concentração álcool 100% realizada duas vezes. Posteriormente, o tecido foi imerso em solução de xilol + álcool (1:1) e em dois banhos de xilol por 10 minutos cada (Silva-Zacarin *et al.*, 2012). Por fim, o material processado foi embebido em histoiresina (10 °C) e emblocado em histoiresina de inclusão (histoiresina de embebição acrescida de catalisador Hardner 15 mL: 5 mL - resina JB-4 - Polysciences, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Alemanha (Chohan; Griffin; Carrell, 2004; Rizzi *et al.*, 2015). Para análise morfológica, $n = 3$ para cada tratamento (controle, e expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil). Após a polimerização e confecção dos blocos de histoiresina foi realizado a microtomia (micrótomo Leica® - RM 2255) para a confecção de lâminas histológicas. Cada lâmina apresentou 12 secções de 2 μm de espessura (Fig. 12).

3.3.2.2. Técnica de Coloração Hematoxilina e Eosina

Após secas a temperatura ambiente durante 24 horas, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram hidratadas em água destilada por 12 segundos. Assim, as lâminas foram imersas em hematoxilina por 40 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram imersas em água por 10 minutos e lavadas em água corrente por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina por 13 minutos à temperatura ambiente, seguido por três banhos de água destilada para remoção do excesso do corante. Após secas à temperatura ambiente, as lâminas foram seladas com ERV-Mount e analisadas por meio do microscópio óptico (Microscópio Leica®-DM1000) através do Leica Application Suite V3.8 (LAS V3.8) (Fig. 12).

Figura 12 – Análise Morfológica

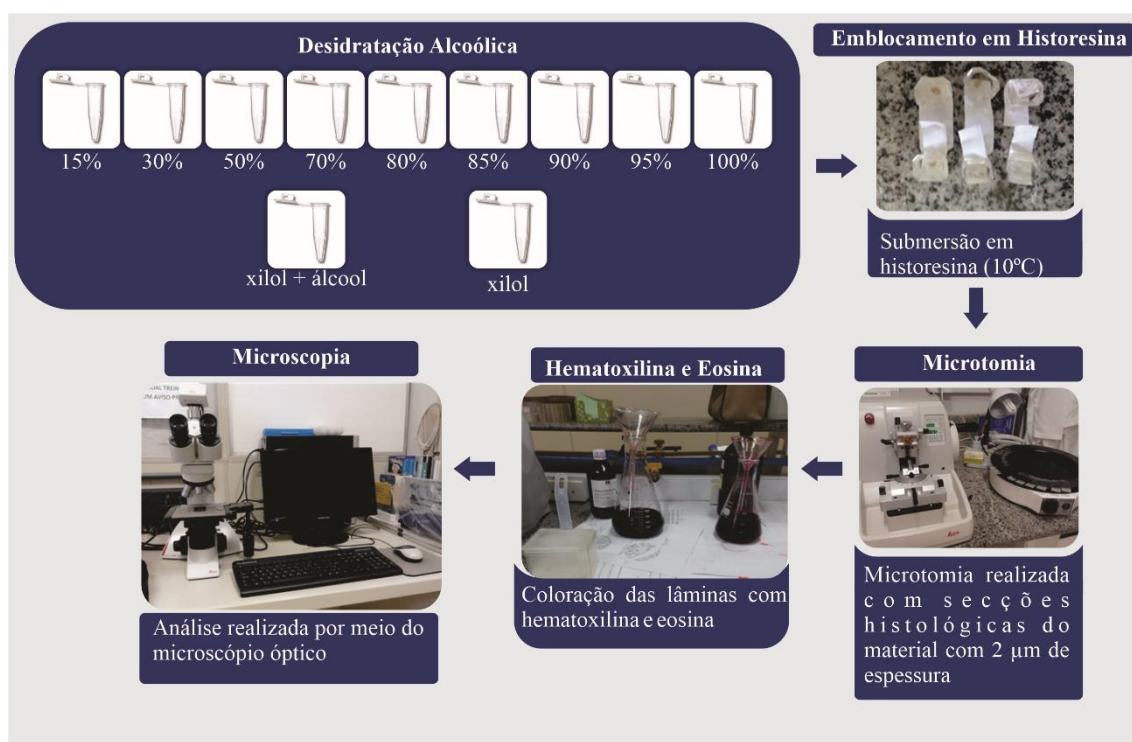


Figura 12 – Análise Morfológica. Análise morfológica foi desenvolvida por meio de processos envolvendo a desidratação alcoólica do material, emblocamento em histoiresina, microtomia, coloração das lâminas histológicas com hematoxilina e eosina e microscopia por meio do microscópio óptico comum. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.3.3. Análise Morfométrica

Após as fotomicrografias das lâminas com HE serem realizadas, as lâminas cujos cortes estavam na mesma altura, ou seja, região mediana dos blocos em histoiresina, foram utilizadas para mensurar as áreas dos trofócitos, enócitos e células pericárdicas do controle e dos grupos expostos. A análise morfométrica foi realizada por meio do software Fiji ImageJ versão IJ/1,54 r (Institutos Nacionais de Saúde dos EUA, Bethesda, Maryland, EUA, disponível em <https://imagej.net/Downloads>) para o delineamento das áreas de trofócitos, enócitos e células pericárdicas (Fig. 13). Assim que as imagens foram abertas e a escala ajustada para padronização da unidade de medida. Na sequência, a delimitação sobre as células para medição das áreas foi realizada. Dessa forma, uma tabela registrava as áreas de todas as células analisadas para os valores serem posteriormente utilizados para análise estatística. Foi realizado a medição da área de 100 células de cada grupo (trofócitos, enócitos e células pericárdicas), para cada tratamento (grupos experimentais e controle).

3.3.3.1. Estatística da Morfometria

A tabela com as áreas geradas no software Fiji ImageJ foi transferida para outro software, GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA). Neste software foi inserido, de forma separada, as colunas com os dados das áreas de somente um dos grupos de células (trofócitos, enócitos ou células pericárdicas) de cada tratamento. Ao final do processo foi obtido as planilhas com as medidas das áreas de cada grupo de células do grupo controle e dos grupos expostos (Fig. 13).

No software GraphPad Prism 8.0.1, o teste de normalidade de Shapiro–Wilk foi aplicado para analisar a distribuição dos dados. Assim, foi realizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn para visualizar quaisquer diferenças significativas entre os grupos (controle e expostos). A significância estatística foi considerada para $P < 0,0001$ para minimizar erros estatísticos. A média \pm desvio padrão foi determinada para cada grupo (Fig. 13).

Figura 13 – Análise Morfométrica

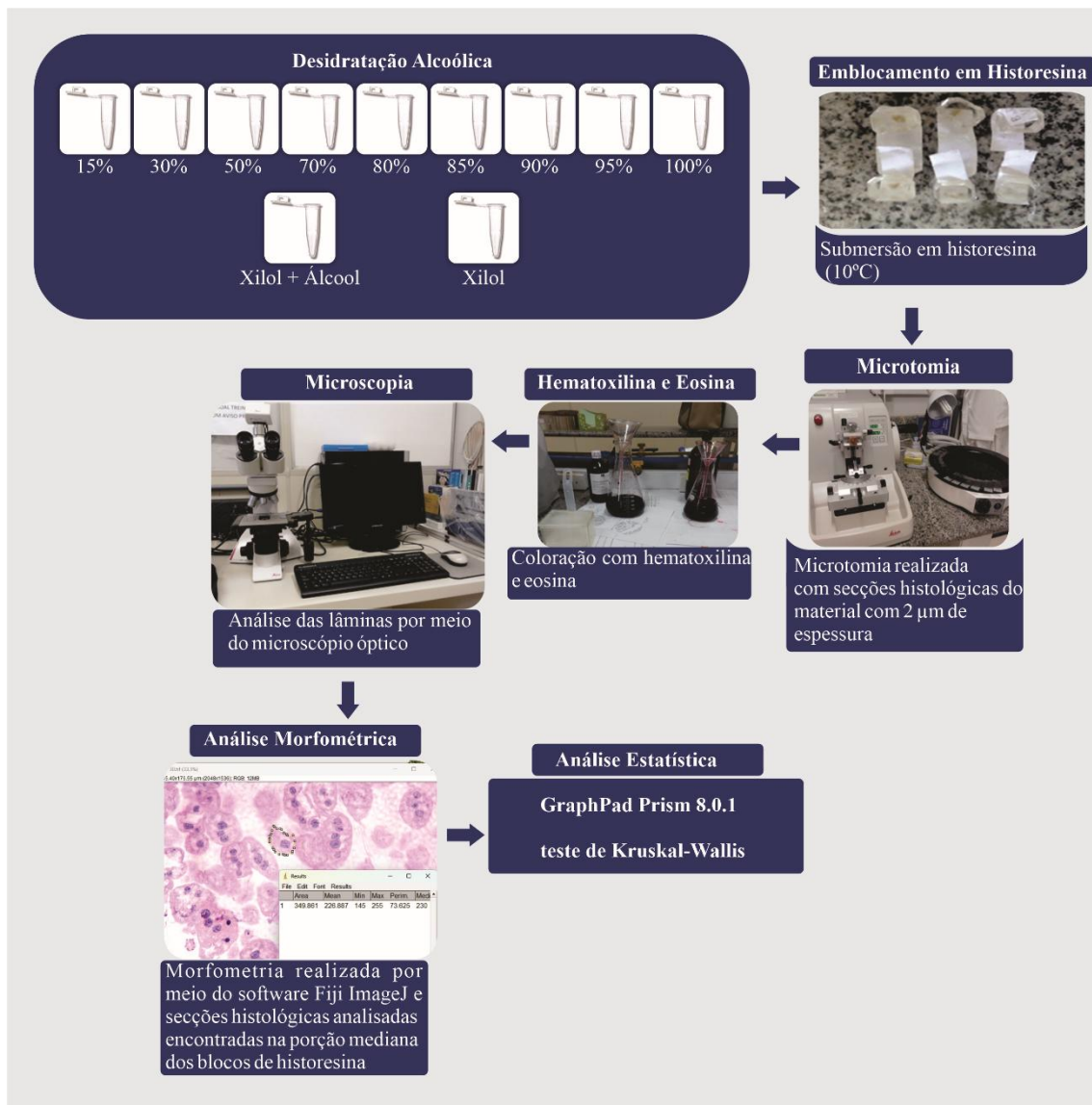


Figura 13 – Análise Morfométrica. Análise morfométrica foi desenvolvida por meio de processos envolvendo a desidratação alcoólica do material, emblocamento em histoiresina, microtomia, coloração das lâminas histológicas com hematoxilina e eosina, microscopia por meio do microscópio óptico comum, análise morfométrica por meio do software Fiji ImageJ e análise estatística da morfometria por meio do software GraphPad Prism 8.0.1. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.3.4. Análise de Genotoxicidade – Ensaio Cometa

3.3.4.1. Maceramento em Solução de Fracionamento

O protocolo utilizado no trabalho foi baseado na padronização do teste do ensaio cometa aplicado em *B. atratus* realizado por Ceschi-Bertoli *et al.* (2020) com adaptações. A análise genotóxica foi realizada com $n = 11$ para cada tratamento (grupos experimentais e controle). Inicialmente, os vasos dorsais armazenados em tubos tipo Eppendorf com o fixador paraformoldeído 4%, receberam dois banhos em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M por 20 minutos cada banho. Em seguida, o material foi imerso em 100 μ L de solução de fracionamento (250 mM de sacarose, 50 mM de Tris-HCl pH 7,4 e 5 mM de $MgCl_2$) e macerado com o auxílio de um pistão rotativo durante 30 minutos (Fig. 14).

3.3.4.2. Centrifugação do Material

O material imerso na solução de fracionamento foi levado ao Agitador Vortex durante 20 minutos. Na sequência foi realizada a centrifugação a 800 G durante 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi separado e adicionado 150 μ L de solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M (Møller *et al.*, 2020; Boeing *et al.*, 2024). O material foi então centrifugado a 1500 G durante 40 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet (precipitado) foi suspenso em 150 μ L de solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M. Em seguida, o pellet (precipitado) foi selecionado e adicionados 150 μ L de solução fosfato (PBS) 0,1 M. Assim, 50 μ L do material foi distribuído em três tubos tipo Eppendorf (Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020; Møller *et al.*, 2020) (Fig. 14).

3.3.4.3. Preparo das Lâminas Histológicas

As lâminas histológicas foram preparadas fervendo três vezes o gel de agarose de grau técnico genético (GTG) (0,3 g em 20 mL de solução salina tamponada com fosfato), seguido pela de imersão das lâminas para formar uma fina camada de agarose (Boeing *et al.*, 2024). As lâminas foram secas em temperatura ambiente durante 24 horas (Møller *et al.*, 2020). Em seguida, a agarose de baixa eletroendosse (LE) (0,1 g em 20 mL de água destilada) foi preparada da mesma forma que a agarose GTG, de forma que 45 μ L foram adicionados no tubo tipo Eppendorf com 50 μ L do material (Ceschi-Bertoli *et al.*, 2020; Møller *et al.*, 2020). A solução formada foi rapidamente transferida para lâmina tratada com agarose GTG, conforme descrito por Boeing *et al.* (2024). Assim, as lâminas foram rapidamente cobertas com uma lamínula para homogeneização e mantidas a 4°C

durante 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas (Collins, 2004) (Fig. 14).

3.3.4.4. Tratamento com Solução de Lise e Eletroforese

As lâminas histológicas foram imersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM de ácido etilenodiaminotetracético - EDTA; 10 mM Tris; 1% N-lauroil-sarcosina; 9% de dimetilsulfóxido e 2% Triton X-100) durante 90 minutos a 4°C (Møller *et al.*, 2020). Em seguida, as lâminas receberam três banho de água destilada para remoção do excesso da solução (Ceschi-Bertolli *et al.*, 2020). Em seguida, as lâminas foram colocadas na cuba eletroforética (Kasvi – K33–15 H, Reino Unido), com gelo ao redor para manter a temperatura do processo. Em seguida, a solução de eletroforese foi adicionada (100 mM EDTA e 0,3 M NaOH, pH 13) e as lâminas permaneceram por 30 minutos. Em seguida, a fonte de alimentação eletroforética foi conectada e ajustada para 25 V e 300 mA por 15 minutos (Møller *et al.*, 2020). As lâminas foram então removidas e receberam três banhos de água destilada para remoção do excesso de solução. Por fim, as lâminas foram secas em temperatura ambiente durante 24 horas (Fig. 14).

3.3.4.5. Tratamento com Solução Fixadora

As lâminas foram colocadas em um suporte (M920 - Stain Tray™, CA), onde receberam a solução fixadora (HCl 4M, Glicerol 1%, ZnSO₄ 7H₂O 0,2 M) durante 10 minutos sem contato com luz (Ceschi-Bertolli *et al.*, 2020; Boeing *et al.*, 2024). Em seguida, as lâminas receberam três banhos de água destilada para retirar o excesso de solução e secas a temperatura ambiente durante 24 horas (Fig. 14).

3.3.4.6. Coloração Fluorescente - DAPI

As lâminas receberam 20 µL do corante fluorescente DAPI e foram cobertas com uma lamínula para homogeneizar a solução durante 20 minutos. As lâminas voltaram para o suporte (M920 - Stain Tray™, CA) sem contato com a luz. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e as lâminas receberam três banhos em solução tampão de fosfato de sódio (PBS) 0,1 M (Ceschi-Bertolli *et al.*, 2020). As lâminas foram secas durante 24 horas e

sem contato com a luz. Por fim, foram analisadas por meio da microscopia de fluorescência (Leica®, DM1000) (Fig. 14).

3.3.4.7. Contagem de Nucleoides

As lâminas histológicas foram analisadas por meio do fotomicroscópio (Leica® DM1000). Para cada lâmina, a contagem de nucleoides foi realizada a partir do estabelecimento de quatro quadrantes (A, B, C e D). Assim, 25 nucleoides por quadrante foram contabilizados e classificados a partir do registro iconográfico. O material de cada indivíduo foi distribuído em três lâminas distintas e foi realizada a contagem de 100 nucleoides por lâmina (25 nucleoides por quadrante). Dessa forma, foi realizado a contagem de 300 nucleoides por indivíduo, totalizando 3300 nucleoides por grupos tratamentos (grupos experimentais e controle) (Costa; Teixeira, 2014; Afanasieva; Sivolob, 2018; Ceschi-Bertolli *et al.*, 2020; Collins *et al.*, 2023). O software CASP (<https://sourceforge.net/projects/casp/>) foi utilizado para classificação dos níveis de danos dos nucleoides analisados. O nível de dano 0 indica dano nulo (< 5%); nível 1, dano baixo (5~20%); nível 2, dano médio (20~40%); nível 3, dano alto (40~95%); nível 4, dano total (>95%) (Singh *et al.*, 1988; Ceschi-Bertolli *et al.*, 2020; Møller *et al.*, 2020; Collins *et al.*, 2023) (Fig. 14).

3.3.4.8. Parâmetros Quantitativos

Após a contagem e classificação dos nucleoides, a quantidade de níveis de dano total por indivíduo para cada tratamento foi utilizada para obtenção de três parâmetros quantitativos: Índice de Dano (ID), Dano Total (DT), e a Frequência de Dano (FD%) (Andrade; Freitas; Silva, 2004; Collins *et al.*, 2023) (Fig. 14).

Índice de Dano total (ID): $ID = 0 \times (\text{número de cometas nível } 0) + 1 \times (\text{número de cometas nível } 1) + 2 \times (\text{número de cometas nível } 2) + 3 \times (\text{número de cometas nível } 3) + 4 \times (\text{número de cometas nível } 4)$.

Dano Total (DT): $DT = \text{nível } 1 + \text{nível } 2 + \text{nível } 3 + \text{nível } 4$.

Frequência de dano (FD%): $FD\% = (DT/300) \times 100$.

3.3.4.9. Estatística do Ensaio Cometa

Os valores do Dano Total obtidos (DT) foram utilizados para realizar a análise estatística do ensaio cometa por meio do software GraphPad Prism 8.0.1. Para determinar a distribuição dos dados, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado. Em seguida foi realizado o teste ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey, com o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. A significância estatística foi considerada para $P < 0,0001$ para minimizar erros estatísticos (Fig. 14).

Figura 14 – Análise Genotóxica

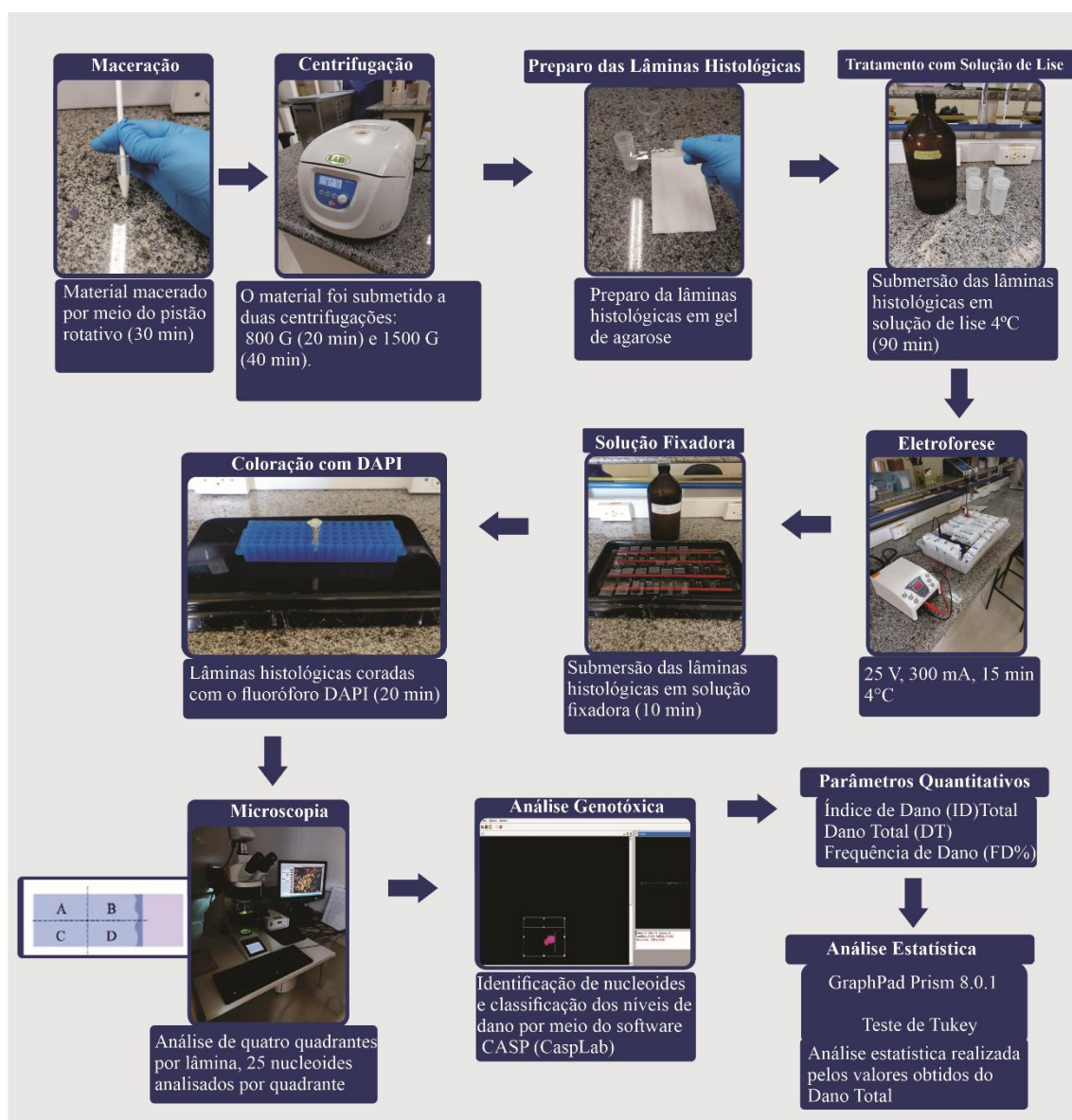


Figura 14 – Análise Genotóxica. Etapas do ensaio cometa consistiram em maceração do material, centrifugação, preparo das lâminas histológica, submersão das lâminas em solução de lise, eletrforese, aplicação da solução fixadora, coloração com o fluoróforo DAPI, microscopia, análise e classificação dos nucleoides por meio do software CASP, estabelecimento dos parâmetros quantitativos e análise estatística dos valores do dano total por meio do software GraphPad Prism 8.0.1.

3.3.5. Análise Histoquímica De Fluorescência

3.3.5.1. Preparo do Material e Emblocamento em Parafina

A análise histoquímica de fluorescência foi realizada com $n = 11$ para cada tratamento (grupos experimentais e controle). Após a dissecação do vaso dorsal, o material foi desidratado em solução crescente de álcool 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% por 10 minutos cada banho. Em seguida, o material recebeu um banho com xilol durante 24 horas. (Silva-Zacarin *et al.*, 2012). O material foi emblocados em parafina (Parafina Histológica em Lentils 58-62 °C - Histopar, Brasil) (Chohan; Griffin; Carrell, 2004; Rizzi *et al.*, 2015). Em seguida, o material recebeu três banhos de parafina durante cinco minutos a 70 °C e, por fim, foi emblocado em parafina, permanecendo durante 24h em temperatura ambiente antes de ser armazenado a 4 °C. As lâminas destinadas para a histoquímica foram previamente lavadas e secas a temperatura ambiente e embebidas em polilisina. Após 24 horas, foi realizado a microtomia do material com secções histológicas com 5,0 μm de espessura. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas, procedimento para remoção da parafina, por meio de um banho com xilol durante 20 minutos, um banho com xilol e álcool (1:1) durante 5 minutos e um banho com álcool 100% durante 10 minutos. Em seguida, foi realizada a reidratação das lâminas em álcool 95%, 70% e 50%, durante 5 minutos cada banho (Fig. 15).

3.3.5.2. Técnica de Coloração Acridine Orange

O corante Acridine Orange (AO) ($\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{N}_3$, 75%, MW: 265.35. MP: 165 °C, Sigma-Aldrich, EUA) foi utilizado para análise histoquímica de fluorescência das células do SHN. As lâminas com as secções histológicas foram colocadas em câmara úmida (M920 - Stain Tray™, CA), onde receberam três banhos de água destilada. Em seguida, as lâminas permaneceram durante 10 minutos em solução preparada com 250 mL de água e 125 μL de Triton X-100. As lâminas receberam três banhos de água destilada e permaneceram em solução tampão citrato (pH 2,5) a 75°C durante cinco minutos. Em seguida, as lâminas voltaram para câmara úmida (M920 - Stain Tray™, CA) e foram coradas com AO, aplicado sobre as lâminas por meio de pipeta Pasteur. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínula para homogeneização da solução e permaneceram sem contato com luz durante 25 minutos. Assim, as lâminas receberam três banhos de água destilada e foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50%, 70% e 100%) durante 30 segundos cada banho. (Chohan *et al.*, 2004; Nogueira *et al.*, 2019;

Rizzi et al., 2015). Após secas à temperatura ambiente, as lâminas foram seladas com ERV-Mount e analisadas por meio do microscópio de fluorescência Leica (DM4000) através do software Leica Application Suite V3.8 (LAS V3.8) (Fig. 15).

O microscópio de fluorescência apresenta filtros para seleção de comprimento de ondas:

- a) UV - BP 420/30, espelho dicromático RKP 415 e filtro supressor BP 465/20;
- b) Azul – BP 495/15, espelho dicromático RKP 510 e filtro supressor BP 530/30;
- c) Verde – BP 570/20 espelho dicromático RKP 590 e filtro supressor BP 640/40.

O microscópio de fluorescência é equipado com diafragmas de campo em moldes circular e retangular para utilização com câmeras de vídeo (câmera digital Leica DFC310 FX para aplicação em Microscopia e Estereomicroscopia) e saída para interface com PC. Para processamento e análise de imagens, foi utilizado o módulo Leica Image Analysis.

Figura 15 – Análise Histoquímica de Fluorescência

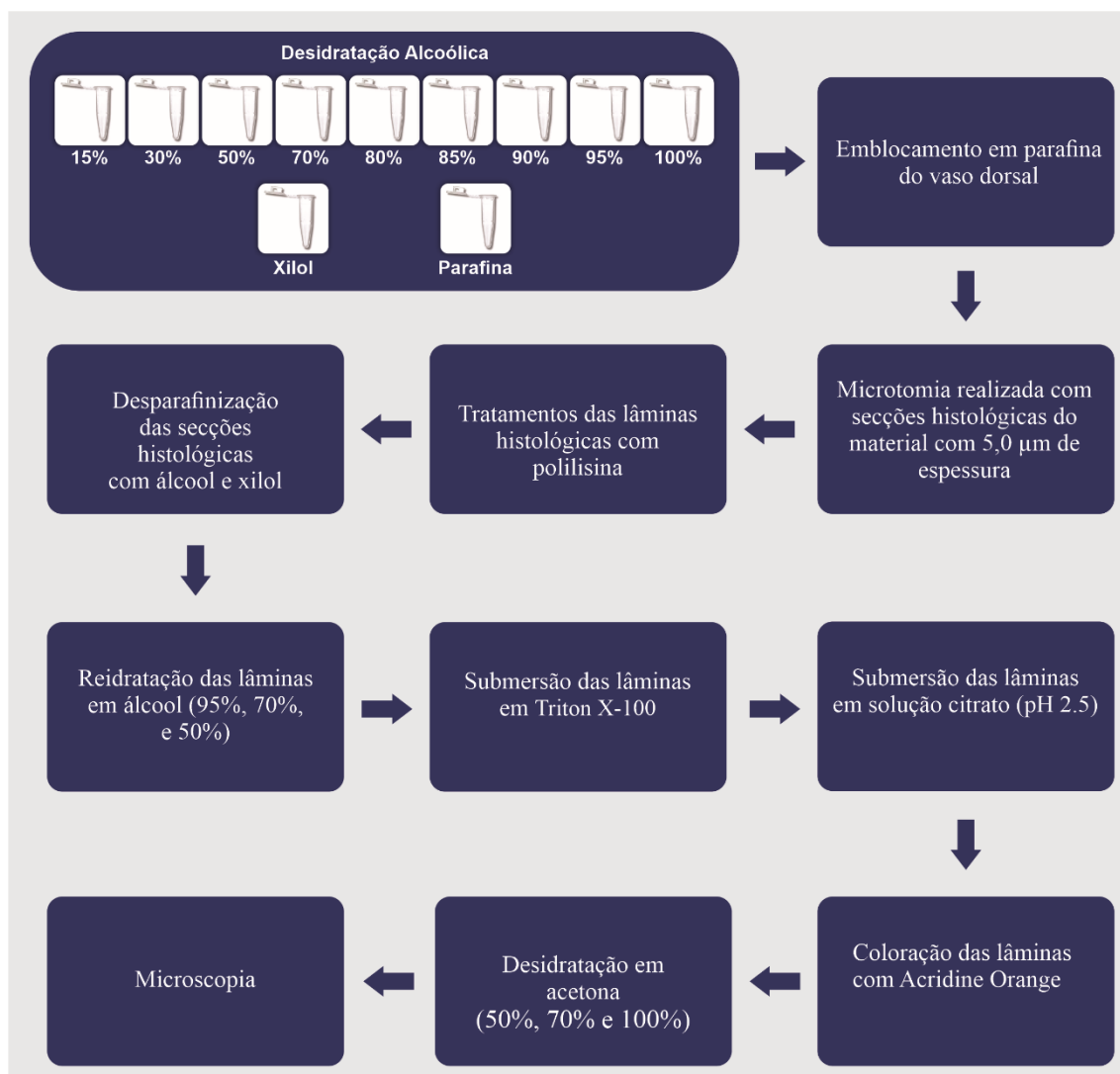


Figura 15 – Análise Histoquímica de Fluorescência. Etapas consistiram em desidratação do material em álcool, embocamento do vaso dorsal em parafina, microtomia, preparo das lâminas histológicas com polilisina, desparafinização do material, reidratação do material em álcool, submersão das lâminas em Triton X-100, submersão das lâminas em solução citrato, coloração das lâminas histológicas com Acridine Orange, desidratação do material em acetona e microscopia. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

3.3.6. Análises Histoquímicas

3.3.6.1. Preparo do Material e Embocamento em Parafina

As análises histoquímicas foram realizadas com $n = 11$ para cada técnica de coloração (PAS, Azul de Bromofenol e Sudan Black) e tratamento (grupos experimentais e controle). Após a dissecação do vaso dorsal, o material foi desidratado em solução crescente de álcool 15%, 30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% por 10 minutos cada banho. Em seguida, o material recebeu um banho com xilol durante 24 horas (Silva-Zacarin *et al.*, 2012). O material foi emborcado em parafina (Parafina Histológica em Lentils 58-62 °C - Histopar, Brasil) (Chohan; Griffin; Carrell, 2004; Rizzi *et al.*, 2015).

Em seguida, o material recebeu três banhos de parafina durante cinco minutos a 70 °C e, por fim, foi emblocado em parafina, permanecendo durante 24h em temperatura ambiente antes de ser armazenado a 4 °C. As lâminas destinadas para a histoquímica foram previamente lavadas e secas a temperatura ambiente e embebidas em polilisina. Após 24 horas, foi realizado a microtomia do material com secções histológicas com 5,0 µm de espessura. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas, procedimento para remoção da parafina, por meio de um banho com xilol durante 20 minutos, um banho com xilol e álcool (1:1) durante 5 minutos e um banho com álcool 100% durante 10 minutos. Em seguida, foi realizada a reidratação das lâminas em álcool 95%, 70% e 50%, durante 5 minutos cada banho. As lâminas receberam três banhos de água destilada e permaneceram em solução tampão citrato (pH 2,5) a 75°C durante cinco minutos (Fig. 16).

3.3.6.2. Técnica de Coloração Azul de Bromofenol

A técnica de coloração Azul de Bromofenol foi realizada para marcação dos conteúdos de proteínas nas células do SHN. Após submersas em tampão citrato (pH 2,5), as lâminas com as secções histológicas receberam um banho com água destilada e submersas no corante Azul de Bromofenol sem contato com luz durante 40 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas receberam um banho de água corrente durante 10 minutos. Por fim, as lâminas receberam um banho de acetona 70% durante 10 segundos e, após completamente secas a temperatura ambiente, foram seladas em ERV – Mount e analisadas por meio do microscópio de óptico (Microscópio Leica®–DM1000) através do software Leica Application Suite V3.8 (LAS V3.8) (Fig. 16).

3.3.6.3. Técnica de Coloração Ácido Periódico de Schiff

A técnica de coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS) foi realizada para marcação dos conteúdos de glicogênio nas células do SHN. Após submersas em tampão citrato (pH 2,5), as lâminas com as secções histológicas receberam um banho com água destilada e foram submersas em ácido periódico 0,4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas receberam um banho de água destilada e transferidas para o suporte (M920 - Stain Tray™, CA) sem contato com a luz até secarem a temperatura ambiente. As lâminas receberam o reativo de Schiff durante 30 minutos, depois foram colocadas em água corrente durante 10 minutos. Por fim, as lâminas

receberam um banho de acetona 70% durante 10 segundos e, após completamente secas a temperatura ambiente, foram seladas em ERV – Mount e analisadas por meio do microscópio de óptico (Microscópio Leica®–DM1000) através do software Leica Application Suite V3.8 (LAS V3.8) Fig. 16).

3.3.6.4. Técnica de Coloração Sudan Black

A técnica de coloração Sudan Black foi realizada para marcação dos conteúdos de triglicérides nas células do SHN. Após submersas em tampão citrato (pH 2,5), as lâminas com as secções histológicas receberam um banho com água destilada. O corante Sudan Black foi utilizado sobre as lâminas de forma individual por meio da pipeta Pasteur. O corante permaneceu sobre as lâminas durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas receberam um banho de água corrente e, com o auxílio de um pincel com cerdas macias, as secções histológicas foram limpas de forma individual para retirar o excesso de corante. Por fim, as lâminas receberam um banho de acetona 70% durante 10 segundos e, após completamente secas a temperatura ambiente, foram seladas em ERV – Mount e analisadas por meio do microscópio de óptico (Microscópio Leica®–DM1000) através do software Leica Application Suite V3.8 (LAS V3.8) (Fig. 16).

Figura 16 – Análises Histoquímicas

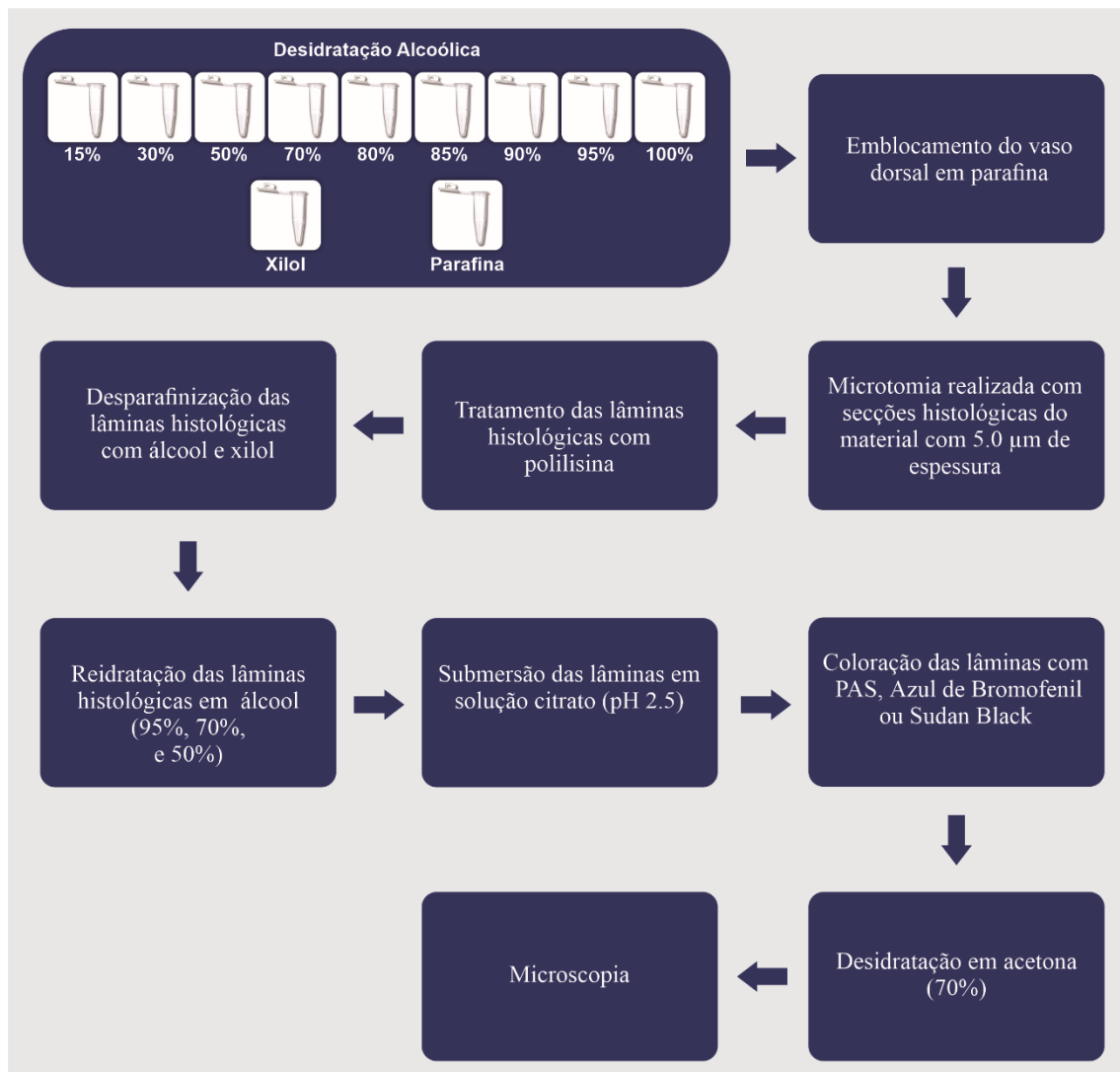


Figura 16 – Análises Histoquímicas. As etapas consistiram em desidratação do material em álcool, embocamento do vaso dorsal em parafina, microtomia, preparo das lâminas histológicas com polilisina, desparafinização do material, reidratação do material em álcool, submersão das lâminas em solução citrato, coloração das lâminas histológicas com PAS, Azul de Bromofenol ou Sudan Black, desidratação do material em acetona e microscopia. Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Análise Morfológica

Os resultados da análise morfológica indicaram que os efeitos subletais do fipronil impactaram as células do SHN em todas as concentrações analisadas. Os danos celulares foram mais acentuados nas exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil.

3.4.1.1. Trofócitos

Os trofócitos (Fig. 17A) do grupo controle apresentaram formato característico, com células poligonais e núcleo ramificado. O citoplasma apresentou muitas granulações, indicando a presença de grânulos citoplasmáticos característico dos trofócitos para armazenamento de moléculas energéticas e eventual mobilização quando necessário.

Os trofócitos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17D) mantiveram o formato poligonal celular característico, similar ao observado no grupo controle (Fig. 17A). No entanto, o núcleo perdeu seu formato típico ramificado assumindo formato elíptico, com indício de danos ao material genético. O citoplasma apresentou granulações e um princípio de vacuolização, o que não foi observado nas células do grupo controle (Fig. 17A). Os resultados indicaram que os trofócitos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17D), embora apresentassem indícios de danos sobre as estruturas celulares, ainda mantiveram a capacidade de armazenar substâncias e desempenhar suas funções. O princípio de vacuolização do citoplasma indicou um início de possível degeneração e colapso dos trofócitos, que poderia evoluir para morte celular caso houvesse extensão do tempo de exposição ao fipronil.

Os trofócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17G) apresentaram formato celular poligonal típico como no controle (Fig. 17A) e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17D). No entanto, o núcleo não apresentou formato típico ramificado, assumindo formato atípico assim como a exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17D). O citoplasma dos trofócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17G) apresentou mais vacúolos em comparação com o controle (Fig. 17A) e a exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17D), embora algumas granulações ainda puderam ser observadas. Os resultados indicaram que o material genético poderia ser afetado pela ação do fipronil e que embora as células ainda mantivessem alguma atividade de armazenamento de moléculas, a vacuolização do citoplasma indicou severos danos a estruturas celulares, comprometendo a capacidade dos trofócitos em realizar suas funções.

A exposição a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ causou danos mais intensos para os trofócitos em relação as demais concentrações. As mesmas características observadas nos trofócitos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17D) e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17G) repetiram-se na exposição a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17J), porém de forma mais intensa. Os núcleos dos trofócitos expostos a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17J) perderam seu formato ramificado característico, assumindo uma forma compactada na periferia celular, enquanto o citoplasma apresentou intensa vacuolização (Fig. 17J). A ausência de grânulos no citoplasma indicou degeneração celular e completa perda da capacidade de realizar a função em armazenar substâncias. Os resultados indicaram colapso e morte celular dos trofócitos expostos a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil.

3.4.1.2. Enócitos

Os enócitos do grupo controle apresentaram formato esférico a elíptico característico. O núcleo apresentou formato esférico e central, sem condensação da cromatina e nenhum dano foi observado no citoplasma (Fig. 17B). Portanto, os enócitos do grupo controle desempenhavam normalmente suas funções, sem indícios de danos celulares.

Os enócitos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ mantiveram seu formato celular esférico característico. O núcleo manteve o formato esférico, mas com indício de cromatina condensada (Fig. 17E). Os resultados diferiram dos enócitos do grupo controle, em que não foi observado cromatina condensada (Fig. 17B). O resultado da exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ indicou enócitos em princípio de picnose celular, enquanto o citoplasma apresentou integridade, sem danos aparentes (Fig. 17E). Desta forma, como os danos celulares foram mínimos, é provável que a funcionalidade celular, como a capacidade para neutralização de substâncias tóxicas e síntese de hidrocarbonetos e lipídios assimilados a estrutura da epicutícula tenham sido preservadas.

Os enócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram formato esférico característico, mas com cromatina fragmentada, indicando princípio de colapso celular e picnose nuclear (Fig. 17H). Essas características não foram observadas nos enócitos do grupo controle (Fig. 17B) e expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 12E), indicando maior toxicidade do fipronil a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$. O citoplasma dos enócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ não apresentaram vacuolização citoplasmática (Fig. 17H). No entanto, a fragmentação da cromatina indicou

que os enócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ foram impactados de maneira severa pela ação do fipronil em comparação com os enócitos do controle e expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$.

Os enócitos expostos a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17L) apresentaram características semelhantes aos enócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17H) e $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17E). No entanto, os danos celulares foram mais acentuados. As células perderam seu formato esférico característico, assumindo forma poligonal ou triangular. O citoplasma não apresentou injúrias aparentes, enquanto os núcleos apresentaram cromatina fragmentada e compactada. Assim como os trofócitos expostos a mesma concentração de fipronil (Fig. 17J), os enócitos estavam em processo de picnose nuclear e morte celular. Os núcleos picnóticos observados nos enócitos expostos a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17L) indicaram colapso de estruturas e comprometimento das funções celulares.

3.4.1.3. Células Pericárdicas

As células pericárdicas do grupo controle foram identificadas em estágio I de ativação, com núcleo central, cromatina descondensada e de formato epitelióide (Fig. 17C). O estágio I de ativação caracteriza-se pela ausência de vacúolos citoplasmáticos no interior das células e baixa atividade pinocítica da hemolinfa. À medida que o organismo dos insetos é intoxicado por algum toxicante, as células pericárdicas são ativadas e realizam pinocitose com mais intensidade, de forma a observar vacúolos citoplasmáticos no interior das células. Os resultados indicaram que as células pericárdicas do grupo controle estavam desempenhando normalmente suas atividades, sem indícios de danos celulares.

As células pericárdicas expostas a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ estavam em estágio II de ativação, com aumento visível do tamanho celular (Fig. 17F). A mesma característica não foi observada para as células pericárdicas do grupo controle, em estágio I de ativação (Fig. 17C). O estágio II de ativação é caracterizado pela fusão de pequenos vacúolos no interior do citoplasma das células pericárdicas, mediante atividade pinocítica das células. Os resultados indicaram que a exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil ativou o mecanismo de filtração da hemolinfa. Os efeitos prolongados da ativação podem resultar em morte celular das células pericárdicas.

As células pericárdicas expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram estágio II e III de ativação, com a fusão de vacúolos menores no interior do citoplasma, fazendo com que um vacúolo maior ocupasse a região central das células pericárdicas, próximo ao núcleo (Fig. 17I). Dessa forma, houve aumento perceptível do tamanho celular devido aos estágios de ativação II e III observado na exposição a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil (Fig. 17I). As células pericárdicas do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17F), estágio II de ativação, não apresentaram vacúolos proeminentes e centrais como as células expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$. As células pericárdicas do grupo controle (Fig. 17C) não apresentaram vacúolos citoplasmáticos (estágio I de ativação). Os resultados indicaram que a exposição a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil causou resposta das células pericárdicas frente à ação do fipronil, o que pode levar a morte celular em algum momento devido à intensa atividade destas células.

As células pericárdicas expostas a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17M) apresentaram estágios II a III de ativação, com vacúolos visíveis no interior do citoplasma, que se fundiram ocupando a região central das células. As mesmas características observadas na exposição a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17I) e $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17F), repetiram-se em $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 17M), com aumento aparente do tamanho celular devido à atividade pinocítica e possibilidade para ocasionar colapso celular. As mesmas características não foram observadas no grupo controle (Fig. 17C), estágio I de ativação.

Figura 17 - Análise Morfológica

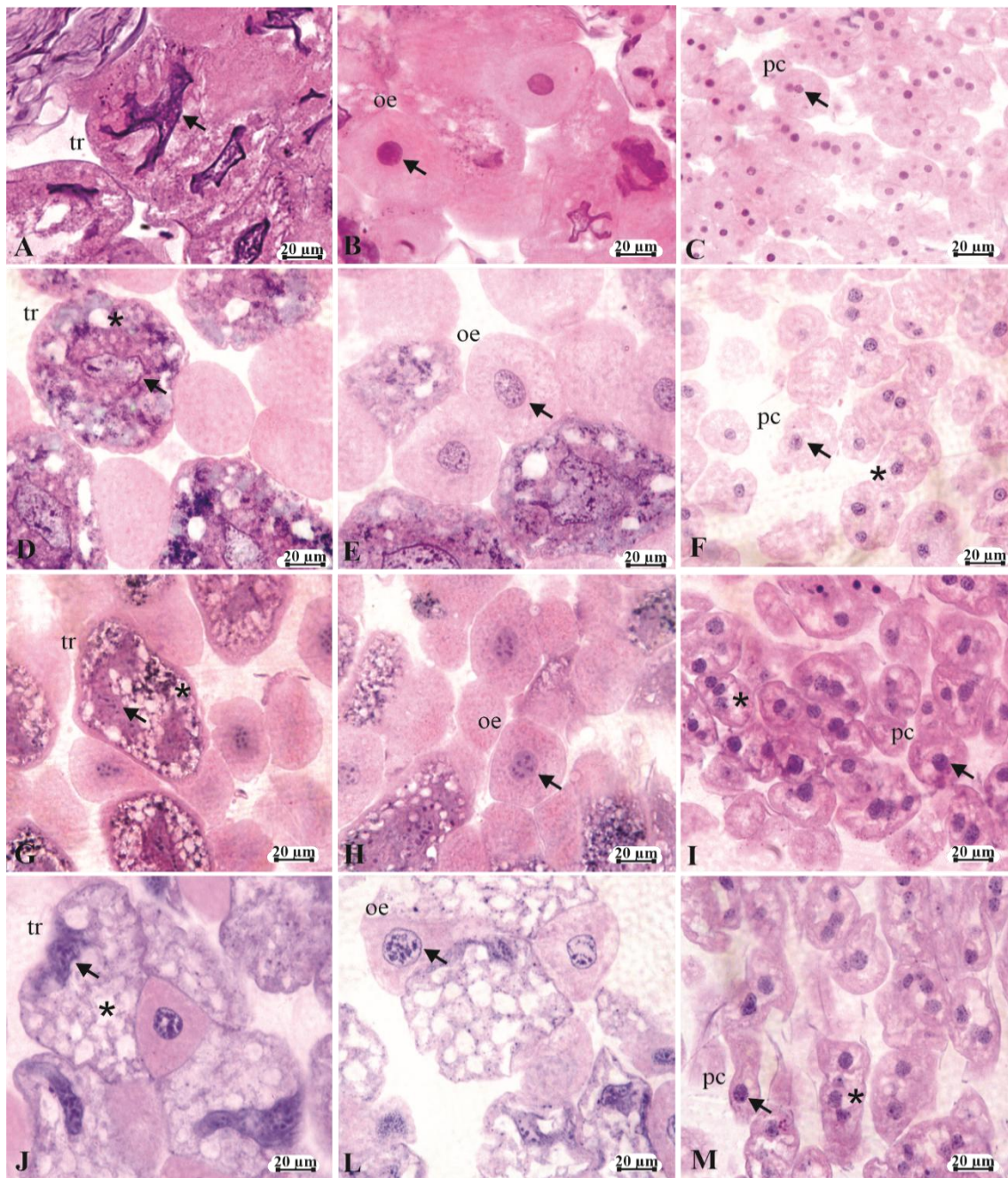


Figura 17: Análise Morfológica realizada por meio da técnica de coloração **Hematoxilina e Eosina** das células do SHN de forrageiras de *B. atratus*. (A) Trofócitos do grupo controle com núcleo ramificado e granulações citoplasmáticas; (B) Enócitos do grupo controle com formato arredondado e cromatina descondensada; (C) Células pericárdicas do grupo controle com disposição epitelióide e estágio I de ativação; (D) Trofócitos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos atípicos e início de vacuolização citoplasmática; (E) Enócitos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com início de fragmentação da cromatina; (F) Células pericárdicas expostas a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ em estágio II de ativação; (G) Trofócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos atípicos e vacuolização citoplasmática; (H) Enócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com fragmentação da cromatina; (I) Células pericárdicas expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ em estágios II e III de ativação; (J) Trofócitos expostos a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleo atípico e vacuolização citoplasmática; (L) Enócitos expostos a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com fragmentação da cromatina; (M) Células pericárdicas expostas a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ em estágios II e III de ativação; **Legenda:** trofócito (tr); enócito (oe); célula pericárdica (pc); (*) indicam os vacúolos citoplasmáticos formados em trofócitos e células pericárdicas expostas ao fipronil; as setas indicam o núcleo das células. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.2. Análise Morfométrica

Após a medição da área das células do SHN do grupo controle e grupos expostos, foi realizada análise estatística da morfometria. Assim, os resultados da variação da área superficial das células de cada grupo celular avaliado (trofócitos, enócitos e células pericárdicas), foram comparados entre o grupo controle e os expostos ao fipronil. O trabalho considerou que valores de $P < 0,0001$ houve diferença significativa entre a área superficial das células dos grupos comparados. Valores de $P \geq 0,0001$ indicaram que não ocorreu diferença significativa em relação à área das células dos grupos celulares analisados e comparados.

A média \pm desvio padrão foram determinados para cada grupo. A tabela 1 indica as médias das áreas dos grupos celulares do controle e dos grupos expostos

TABELA 1 - Média das Áreas e Desvio Padrão

Grupos	Trofócitos	Enócitos	Células Pericárdicas
	Média \pm SD	Média \pm SD	Média \pm SD
Controle	2310 \pm 661,2	1753 \pm 290,9	144,3 \pm 41,40
Exposto 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	2083 \pm 643,6	1558 \pm 367,4	270,8 \pm 93,69*
Exposto 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	1531 \pm 612,8*	1005 \pm 276,9*	280,0 \pm 85,62*
Exposto 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	1164 \pm 375,7*	773,4 \pm 323,0*	268,8 \pm 80,22*

Tabela 1 – Média das Áreas e Desvio Padrão das células do SHN. Valores da média e desvio padrão da medição da área superficial das células do SHN analisadas do grupo controle e expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. (*) indicam os grupos que apresentaram diferença da área celular em comparação ao controle. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Os dados da média e desvio padrão indicaram de forma clara uma diminuição da área superficial dos trofócitos e enócitos, e um aumento da área das células pericárdicas conforme as exposições à crescentes doses de fipronil.

3.4.2.1. Trofócitos

A análise morfométrica indicou que ocorreu diminuição progressiva da área dos trofócitos, diretamente relacionada com o aumento da concentração de fipronil utilizada. Ocorreu diminuição da área dos trofócitos entre o controle e 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$), controle e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$) e entre todos os tratamentos do grupo exposto, 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$), 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$). Somente não houve diferença da variação da área entre controle e 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P = 0,3432$) e entre 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ ($P = 0,0005$) (Fig. 18) (Apêndice A).

Figura 13 - Morfometria dos Trofócitos

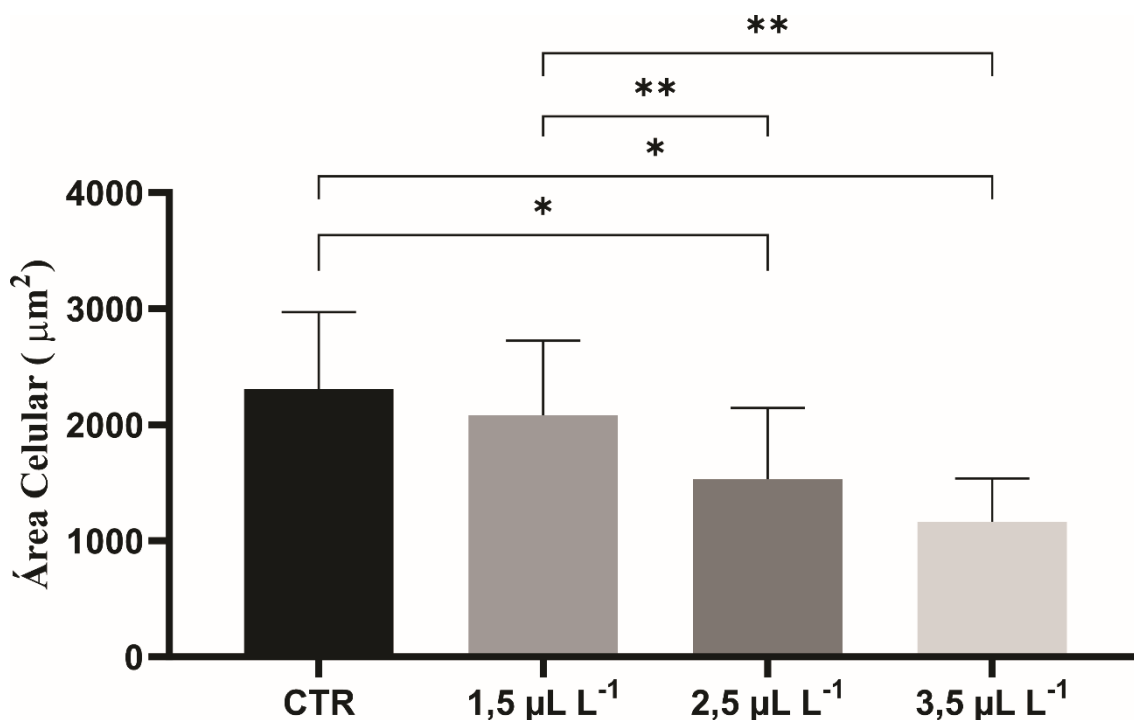


Figura 18 – Morfometria dos Trofócitos. Diminuição da área dos trofócitos entre o controle e 2,5 µL L⁻¹; controle e 3,5 µL L⁻¹. Entre os grupos exposto, diminuição da área entre 1,5 µL L⁻¹ e 2,5 µL L⁻¹, 1,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. Não houve diferença da área superficial celular entre o controle e 1,5 µL L⁻¹, 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. (*) Legenda: diferença significativa entre controle e exposto ($P < 0,0001$). (**) Legenda: diferença significativa entre grupos expostos ($P < 0,0001$). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.2.2. Enócitos

A análise morfométrica indicou que assim como nos trofócitos, ocorreu diminuição progressiva da área dos enócitos, diretamente relacionado com o aumento da concentração de fipronil. Ocorreu diminuição da área dos enócitos entre controle e exposição a 2,5 µL L⁻¹ ($P < 0,0001$), controle e 3,5 µL L⁻¹ ($P < 0,0001$), grupos expostos a 1,5 µL L⁻¹ e 2,5 µL L⁻¹ ($P < 0,0001$) e 1,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹ ($P < 0,0001$) (Fig. 19). Não houve diferença da área das células entre controle e 1,5 µL L⁻¹ ($P = 0,0383$) e 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹ ($P = 0,0102$) (Fig. 19) (Apêndice B).

Figura 19 - Morfometria dos Enócitos

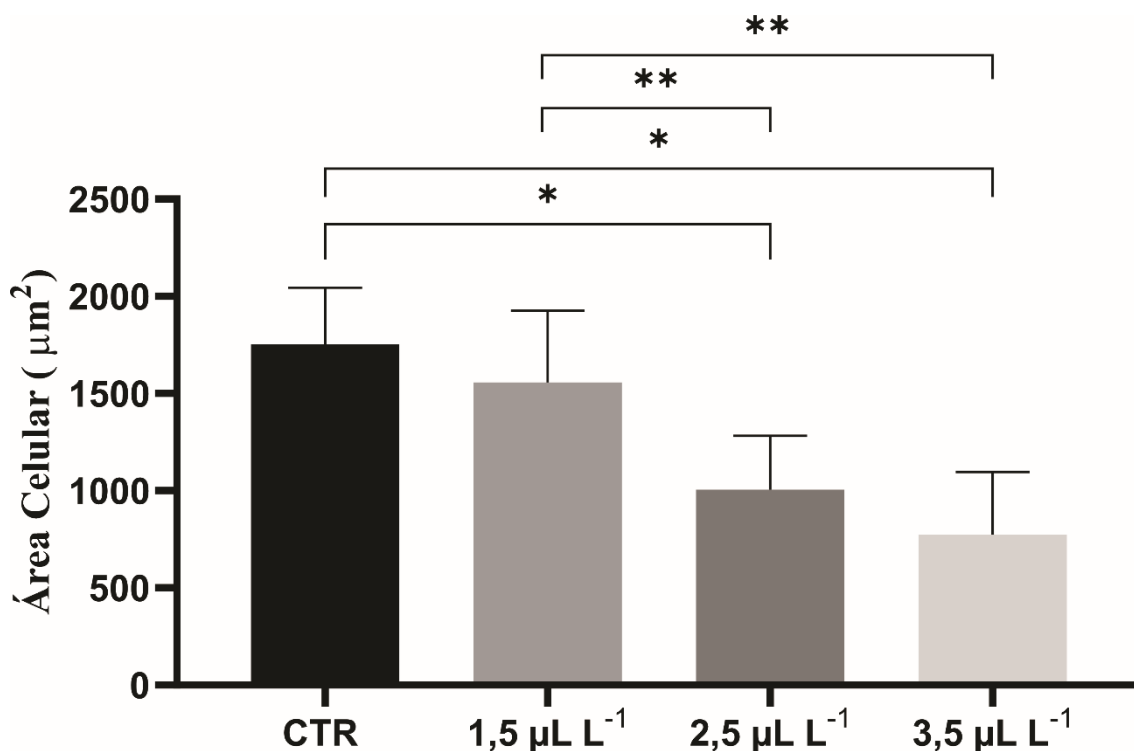


Figura 19 – Morfometria dos Enócitos. Diferença da área dos enócitos entre o controle e 2,5 µL L⁻¹, controle e 3,5 µL L⁻¹. Entre os grupos expostos, diferença entre 1,5 µL L⁻¹ e 2,5 µL L⁻¹, 1,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. Não houve diferença significativa entre controle e 1,5 µL L⁻¹, 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. (*) Legenda: diferença significativa entre controle e exposto ($P < 0,0001$). (**) Legenda: diferença significativa entre grupos expostos ($P < 0,0001$). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.2.3. Células Pericárdicas

A análise morfométrica indicou que ocorreu aumento da área das células pericárdicas em todos os grupos expostos ao fipronil. Ocorreu um aumento na área das células pericárdicas em relação ao controle nos grupos expostos a 1,5 µL L⁻¹ ($P < 0,0001$), 2,5 µL L⁻¹ ($P < 0,0001$) e 3,5 µL L⁻¹ ($P < 0,0001$). Entretanto, não houve diferença entre os grupos expostos a 1,5 µL L⁻¹ e 2,5 µL L⁻¹ ($P > 0,9999$), 1,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹ ($P > 0,9999$), 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹ ($P > 0,9999$) (Fig. 20) (Apêndice C).

Figura 20 - Morfometria das Células Pericárdicas

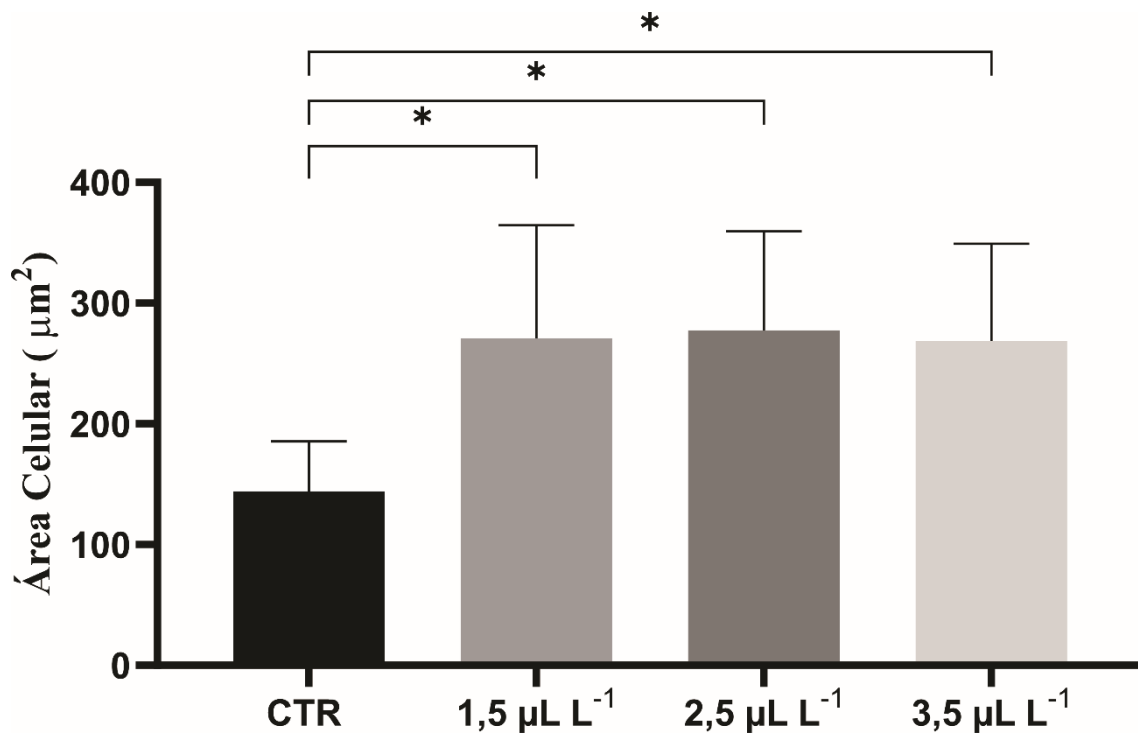


Figura 20 – Morfometria das Células Pericárdicas. Aumento da área das células pericárdicas entre o controle e 1,5 µL L⁻¹, controle e 2,5 µL L⁻¹, controle e 3,5 µL L⁻¹. Não houve diferença da variação da área celular entre os grupos expostos. (*) Legenda: diferença significativa entre controle e exposto ($P < 0,0001$).
Fonte: elaborada pelo próprio autor

3.4.3. Análise Genotóxica

A análise genotóxica foi realizada por meio do ensaio cometa e os resultados obtidos foram utilizados para classificação dos níveis de dano, cálculo dos parâmetros quantitativos (índice de dano, dano total e frequência de dano). A análise estatística dos resultados foi realizada por meio da comparação entre os resultados obtidos para o dano total em cada grupo.

3.4.3.1. Classificação dos Níveis de Dano

A classificação dos níveis de dano foi importante para a compreensão dos efeitos da ação do fibronil em diferentes concentrações sobre as células do SHN e para o cálculo dos três parâmetros quantitativos, utilizados com o mesmo objetivo. A classificação dos níveis de dano indicou que o grupo controle e o exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram predominantemente nível de dano 0, sem danos ao material genético (média do nível de dano 0 = 273,27 para o controle e 259,73 para exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$). Os grupos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram predominantemente nível de dano 2, indicando nível de dano médio (média do nível de dano 2 = 108,81 para exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e 129 para exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$). O nível de dano 3, indicando nível de dano alto, também foi observado nas exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, (média do nível de dano 3 = 87,64 para exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e 85,55 para exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$). Na atual pesquisa, o nível de dano 3 apresentou menor incidência em relação ao nível de dano 2 nos grupos expostos analisados. O nível de dano 4, dano total ao DNA, não foi observado em nenhum dos tratamentos. Os registros da classificação dos níveis de dano foram demonstrados na figura 21.

Figura 21 - Classificação dos Níveis de Dano

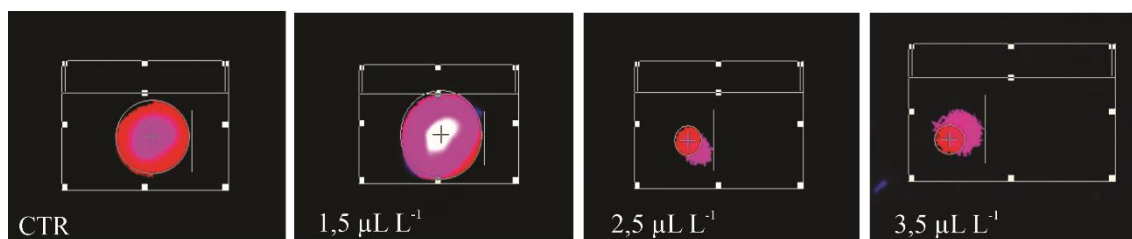


Figura 21 - Classificação dos Níveis de Dano. Grupos controle e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$: predomínio de nível de dano 0 (ausência de dano). Grupos exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$: predomínio de nível de dano 2 (dano médio). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.3.2. Parâmetros Quantitativos

Os resultados do índice de dano, dano total e frequência de dano indicaram que o fipronil causou danos ao material genético em todos os tratamentos, porém os danos foram mais acentuados nos grupos expostos a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (tabela 4) e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (tabela 5). O grupo controle praticamente não apresentou danos ao material genético (tabela 2) e o grupo exposto a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (tabela 3) apresentou um panorama próximo ao observado no controle (tabela 2), com danos ao material genético mais brandos em comparação às exposições a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (tabela 4) e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (tabela 5).

TABELA 2 – Intensidade de Danos e Parâmetros Quantitativos do Grupo Controle

Controle	Intensidade de Danos do DNA					Índice de Dano	Dano Total	Frequência de Dano
	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	ID	DT	FD%
01	282	18	0	0	0	18	18	6%
02	278	22	0	0	0	22	22	7,33%
03	282	18	0	0	0	18	18	6%
04	261	39	0	0	0	39	39	13%
05	279	21	0	0	0	21	21	7%
06	274	26	0	0	0	26	26	8,67%
07	271	29	0	0	0	29	29	9,67%
08	276	24	0	0	0	24	24	8%
09	270	30	0	0	0	30	30	10%
10	264	36	0	0	0	36	36	12%
11	269	31	0	0	0	31	31	10,33%
Média	273,27	26,73	0	0	0	26,73	26,73	8,91%

Tabela 2 - Grupo Controle. Valores e médias da intensidade de danos e dos parâmetros quantitativos (índice de dano, dano total e frequência de dano). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

TABELA 3 – Intensidade de Danos e Parâmetros Quantitativos do Grupo
Exposto a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$

1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	Intensidade de Danos do DNA					Índice de Dano	Dano Total	Frequência de Dano
	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	ID	DT	FD%
01	257	43	0	0	0	43	43	14,33%
02	265	35	1	0	0	37	36	12%
03	256	44	0	0	0	44	44	14,67%
04	269	31	0	0	0	31	31	10,33%
05	261	39	0	0	0	39	39	13%
06	271	29	0	0	0	29	29	9,67%
07	254	46	0	0	0	46	46	15,33%
08	257	43	0	0	0	43	43	14,33%
09	253	46	1	0	0	48	47	15,67%
10	265	35	0	0	0	35	35	11,67%
11	249	50	1	0	0	52	51	17%
Média	259,73	40,09	0,27	0	0	40,64	40,36	13,45%

Tabela 3 - Grupo Exposto 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$. Valores e médias da intensidade de danos e dos parâmetros quantitativos (índice de dano, dano total e frequência de dano). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

TABELA 4 - Intensidade de Danos e Parâmetros Quantitativos do Grupo
Exposto a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$

2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	Intensidade de Danos do DNA					Índice de Dano	Dano Total	Frequência de Dano
	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	ID	DT	FD%
01	90	8	114	88	0	500	210	70%
02	63	26	117	94	0	542	237	79%
03	79	28	96	97	0	511	221	73,67%
04	74	39	110	77	0	490	226	75,33%
05	71	35	100	94	0	517	229	76,33%
06	72	28	108	92	0	520	228	76%
07	80	17	102	101	0	524	220	73,33%
08	87	20	110	83	0	489	213	71%
09	90	25	98	87	0	482	210	70%
10	79	21	114	86	0	507	221	73,67%
11	85	22	128	65	0	473	215	71,67%
Média	79,09	24,45	108,81	87,64	0	505	220,91	73,64%

Tabela 4 - Grupo Exposto 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$. Valores e médias da intensidade de danos e dos parâmetros quantitativos (índice de dano, dano total e frequência de dano). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

TABELA 5 - Intensidade de Danos e Parâmetros Quantitativos do Grupo Exposto a 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$

3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	Intensidade de Danos do DNA					Índice de Dano	Dano Total	Frequência de Dano
	Nível 0	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	ID	DT	FD%
01	73	3	138	86	0	537	227	75,67%
02	68	12	139	81	0	533	232	77,33%
03	84	10	131	75	0	497	216	72%
04	75	19	122	84	0	515	225	75%
05	79	15	119	87	0	514	221	73,67%
06	82	16	121	81	0	501	218	72,67%
07	68	9	124	99	0	554	232	77,33%
08	77	8	141	74	0	512	223	74,33%
09	65	14	137	84	0	540	235	78,33%
10	81	10	123	86	0	514	219	73%
11	62	10	124	104	0	570	238	79,33%
Média	74	11,45	129	85,55	0	526,09	226	75,33%

Tabela 5 - Grupo Exposto 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$. Valores e médias da intensidade de danos e dos parâmetros quantitativos (índice de dano, dano total e frequência de dano). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Os dados das tabelas 2, 3, 4 e 5 foram utilizados para construção dos gráficos das figuras 22, 23 e 24, com os valores das médias do dano total, índice de dano e frequência de dano, respectivamente. Os gráficos evidenciaram a genotoxicidade do fipronil mais intensa para as exposições a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$.

Figura 22 - Dano Total

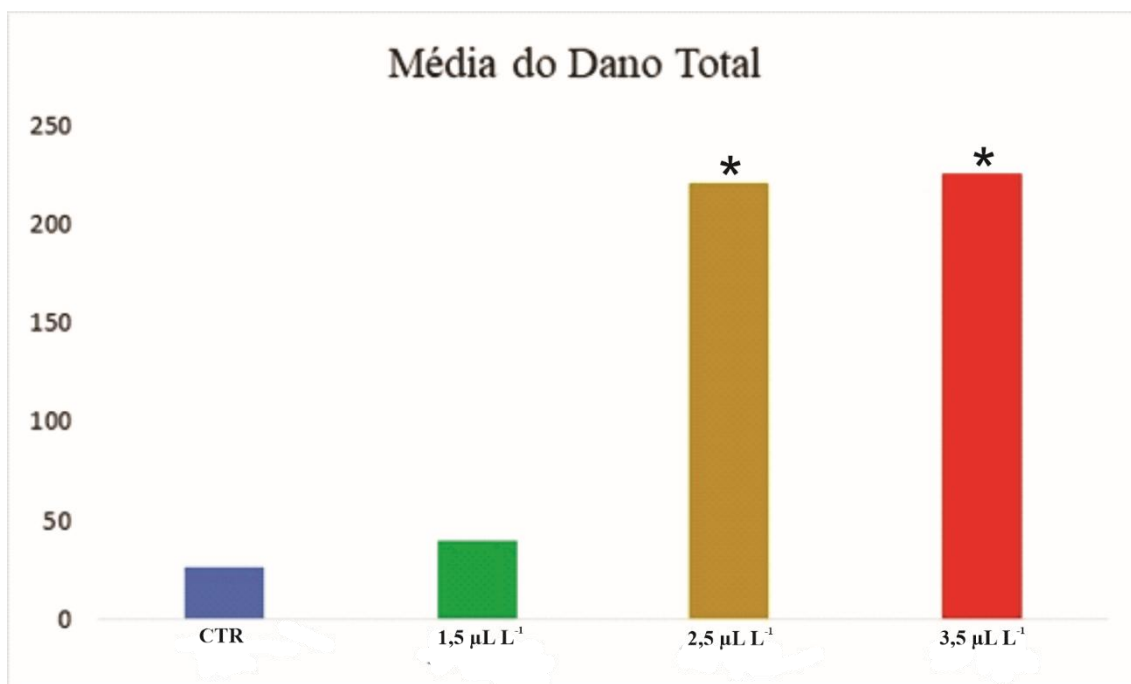


Figura 22 - Média do Dano Total. Média do dano total foi maior nos grupos expostos em relação ao controle, com danos mais acentuados para as exposições a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. (*) Indicam dano total mais acentuado para as exposições a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Figura 23 - Índice de Dano

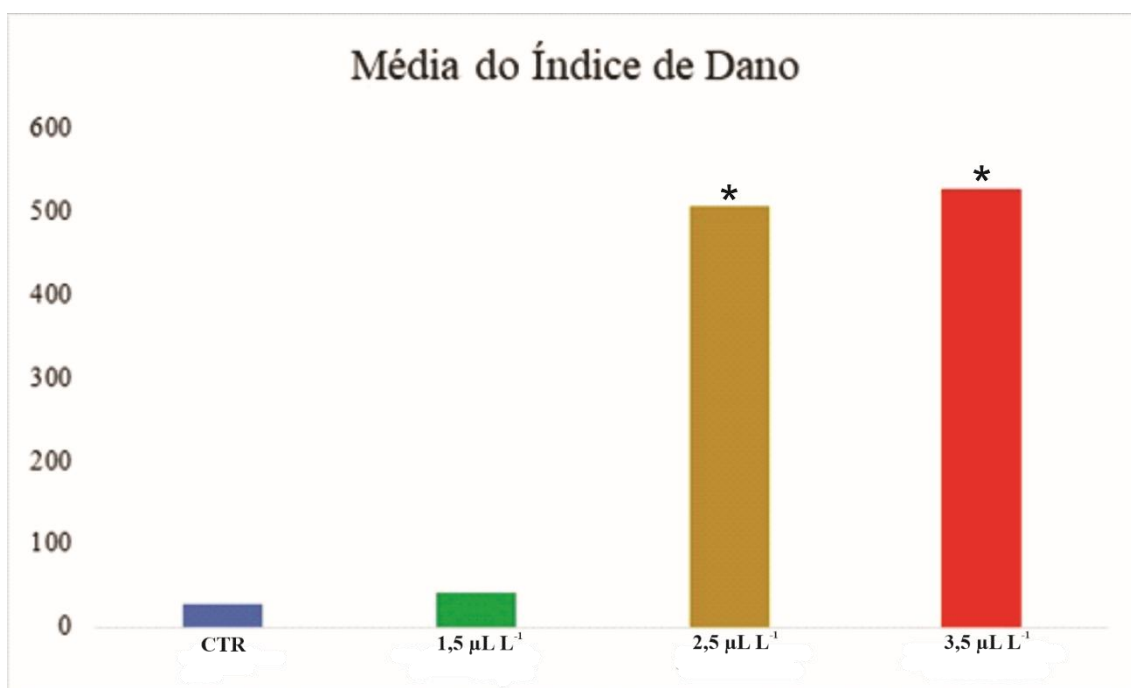


Figura 23 - Média do Índice de Dano. Média do índice de dano foi maior nos grupos expostos em relação ao controle, com danos mais acentuados para as exposições a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. (*) Indicam índice de dano mais acentuado para as exposições a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Figura 24 - Frequência de Dano

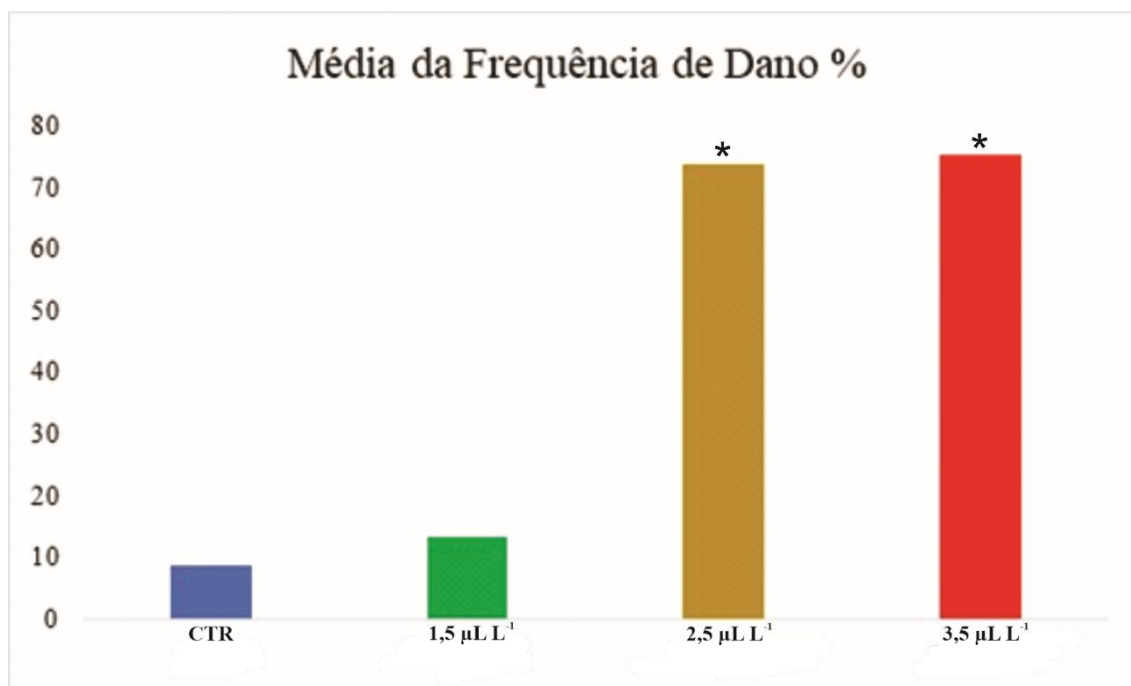


Figura 24 - Média do Frequência de Dano %. Média da frequência de dano foi maior nos grupos expostos em relação ao controle, com danos mais acentuados para as exposições a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. (*) Indicam frequência de dano mais acentuada para as exposições a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

A média ± desvio padrão também foram determinados para cada grupo. A tabela 6 indica a média e o desvio padrão de todos os tratamentos, evidenciando os danos genotóxicos nos grupos expostos, de forma mais acentuada para as exposições a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹ de fipronil.

TABELA 6 – Parâmetros Quantitativas e Desvio Padrão

Grupos	Índice de Dano	Dano Total	Frequência de Dano
	Média ± SD	Média ± SD	Média ± SD
Controle	26,73 ± 6,973	26,73 ± 6,973	8,91% ± 2,324
Exposto 1,5 µL L ⁻¹	40,64 ± 7,145	40,36 ± 6,947	13,45% ± 2,315
Exposto 2,5 µL L ⁻¹	505 ± 20,49*	220,91 ± 8,584*	73,64% ± 2,861*
Exposto 3,5 µL L ⁻¹	526,09 ± 22,71*	226 ± 7,389*	75,33% ± 2,461*

Tabela 6 – Parâmetros Quantitativos e Desvio Padrão. Efeitos genotóxicos do fipronil sobre as células do SHN de *B. atratus*. Efeitos acentuados para as exposições a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. (*) indicam efeitos mais acentuados para as células expostas a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹ de fipronil. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.3.3. Análise Estatística - Ensaio Cometa

Os valores do Dano Total (DT) de cada indivíduo em todos os tratamentos (grupos experimentais e grupo controle) foram utilizados como dados para realização da análise estatística do teste de genotoxicidade por meio do ensaio cometa. Os valores de $P < 0,0001$ indicaram diferença significativa entre o DT dos indivíduos dos tratamentos comparados, enquanto valores de $P \geq 0,0001$ indicaram que as amostras não diferiram significativamente quanto aos níveis de dano ao material genético.

A análise estatística do ensaio cometa deixou evidente que os danos genotóxicos mais acentuados sobre as células do SHN foram causados pelas exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Houve diferença de danos totais entre o grupo controle e exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$) e entre controle e exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$). Não houve diferença entre o controle e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P = 0,0002$). Entre os grupos expostos houve diferença entre $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$), $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P < 0,0001$), mas não houve diferença entre $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ ($P = 0,1194$) (Fig. 25) (Apêndice D).

Figura 25 - Análise Estatística do Dano Total

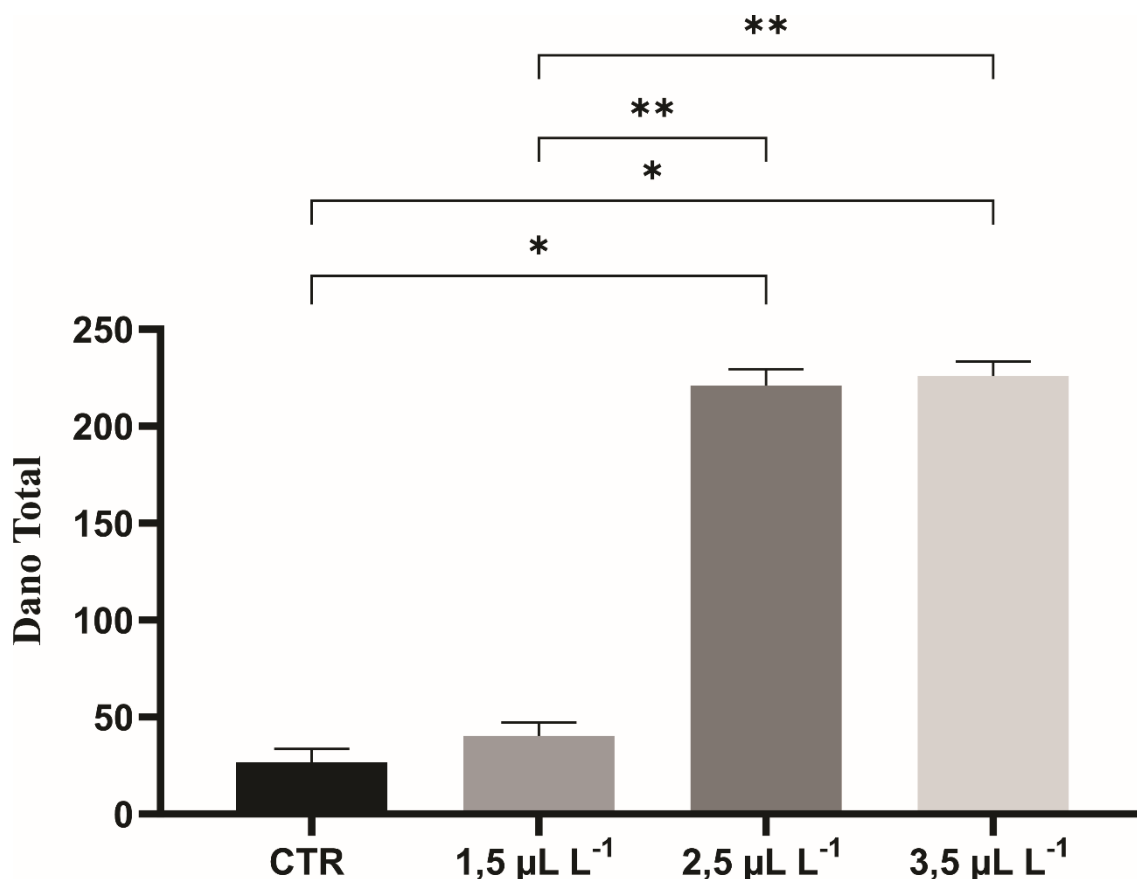


Figura 25 – Análise Estatística do Dano Total. Diferença do dano total entre controle e exposto a 2,5 µL L⁻¹; controle e exposto a 3,5 µL L⁻¹. Não houve diferença entre controle e exposto a 1,5 µL L⁻¹. Entre os grupos expostos diferença entre 1,5 µL L⁻¹ e 2,5 µL L⁻¹, 1,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. Não houve diferença significativa entre os grupos expostos a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. (*) Legenda: diferença significativa entre controle e exposto ($P < 0,0001$); (**) Legenda: diferença significativa entre grupos expostos ($P < 0,0001$). Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.4. Análise Histoquímica de Fluorescência

3.4.4.1. Trofócitos

A análise histoquímica de fluorescência complementou os resultados da análise genotóxica, demonstrando danos ao material genético causados pela fragmentação da cromatina. Os trofócitos do grupo controle (Fig. 26A) e expostos a 1,5 µL L⁻¹ (Fig. 26D) apresentaram núcleos verdes, o que indica que o material genético não foi fragmentado. Os resultados indicaram que não ocorreu danos genotóxicos do fipronil na exposição a 1,5 µL L⁻¹. As exposições a 2,5 µL L⁻¹ (Fig. 26G) e 3,5 µL L⁻¹ (Fig. 26J), em contrapartida, apresentaram trofócitos com núcleos vermelhos, indicando cromatina fragmentada devido à genotoxicidade do fipronil sobre essas células.

3.4.4.2. Enócitos

O mesmo padrão em relação aos danos sobre o material genético observado nos trofócitos foram similares aos observados nos enócitos. Os enócitos do grupo controle (Fig. 26B) e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 26E) apresentaram núcleos verdes, indicando cromatina intacta, estrutura do material genético em fita dupla e ausência de fragmentação da cromatina. Os enócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 26H) e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 26L) apresentaram núcleos vermelhos, indicando fragmentação da cromatina devido aos efeitos genotóxicos do fipronil, de forma que o DNA fragmentado apresentou fitas simples, marcadas pelo Acridine Orange em vermelho. A técnica de coloração evidenciou a maior genotoxicidade do fipronil a partir da exposição a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$.

3.4.4.3. Células Pericárdicas

As células pericárdicas do grupo controle (Fig. 26C) e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 26F) apresentaram núcleos verdes, indicando que o material genético não foi impactado pela ação do fipronil. As células expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 26I) e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 26M) apresentaram núcleos vermelhos, indicando compactação e fragmentação da cromatina devido à ação genotóxica do fipronil, assim como os resultados observados com os trofócitos e enócitos expostos às mesmas concentrações.

Figura 26 - Análise Histoquímica de Fluorescência

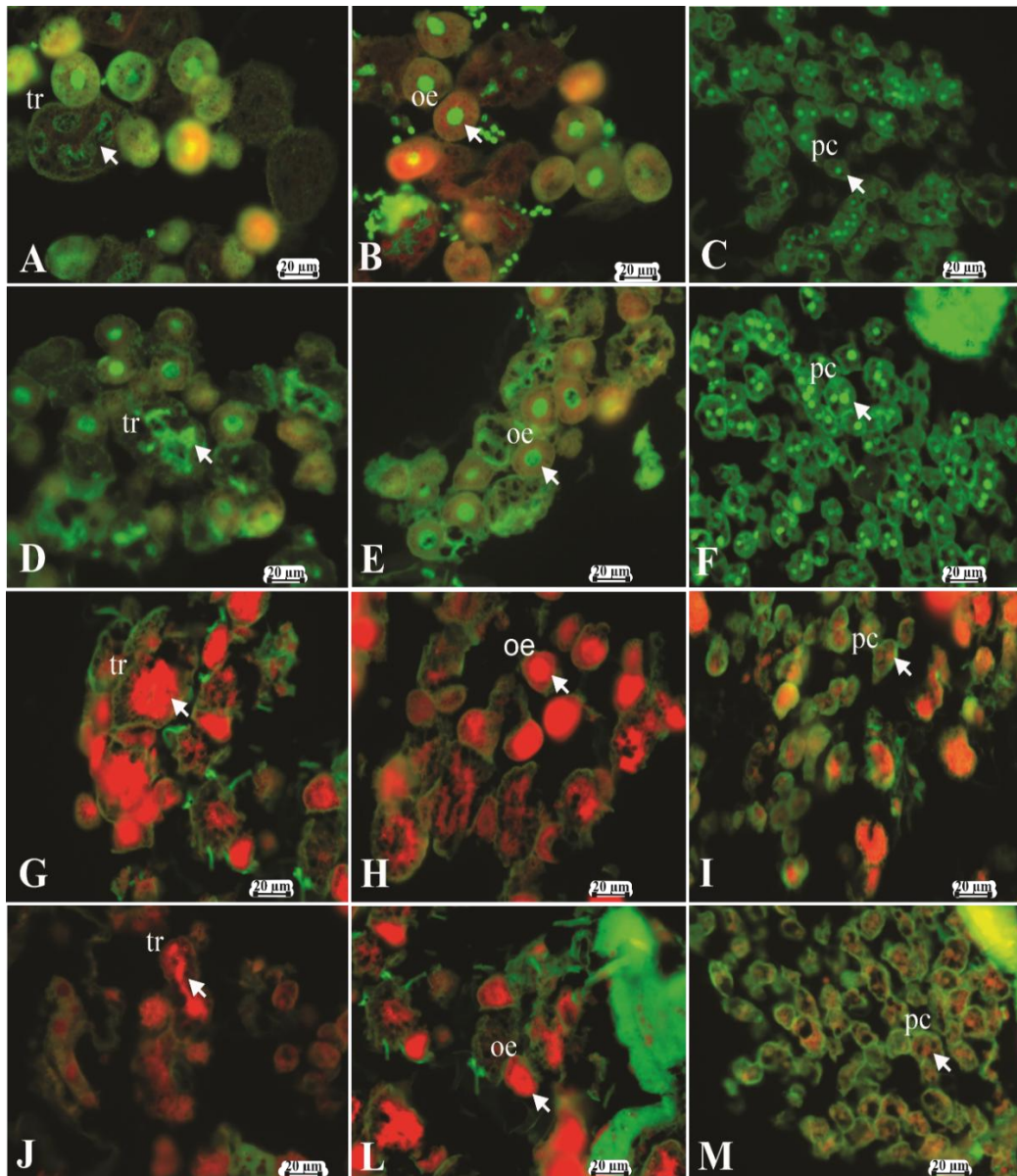


Figura 26 - Análise Histoquímica de Fluorescência realizada por meio da técnica de coloração **Acridine Orange** das células do SHN de forrageiras de *B. atratus*. (A) Trofócitos do grupo controle com núcleos verdes indicando integridade do DNA; (B) Enócitos do grupo controle com núcleos verdes indicando integridade do DNA; (C) Células pericárdicas do grupo controle com núcleos verdes indicando integridade do DNA; (D) Trofócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos verdes indicando integridade do DNA; (E) Enócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos verdes indicando integridade do DNA; (F) Células pericárdicas do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos verdes indicando integridade do DNA; (G) Trofócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos vermelhos indicando fragmentação da cromatina; (H) Enócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos vermelhos indicando fragmentação da cromatina; (I) Células pericárdicas do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos vermelhos indicando fragmentação da cromatina; (J) Trofócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos vermelhos indicando fragmentação da cromatina; (L) Enócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos vermelhos indicando fragmentação da cromatina; (M) Células pericárdicas do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ com núcleos vermelhos indicando fragmentação da cromatina. **Legenda:** trofócito (tr); enócito (oe); célula pericárdica (pc); as setas indicam o núcleo celular. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.5. Análises Histoquímicas

3.4.5.1. PAS

3.4.5.1.1. *Trofócitos*

Os resultados indicaram que as exposições a doses subletais de fipronil encontradas em campo e analisadas na pesquisa não causaram variação do conteúdo de glicogênio no citoplasma dos trofócitos dos grupos expostos em *B. atratus*. Os trofócitos do grupo controle (Fig. 27A) e grupos expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27D), 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27G) e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27J) foram marcados pelo PAS com a mesma intensidade, indicando que o citoplasma apresentou granulações de glicogênio em todos os tratamentos analisados. Os trofócitos da exposição a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27D) foram marcados com a mesma intensidade em comparação com os trofócitos do grupo controle (Fig. 27A). Os trofócitos expostos a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27G) foram marcados pelo PAS com a mesma intensidade que os trofócitos do grupo controle (Fig. 27A) e expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27D). Os trofócitos do grupo exposto a 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27J) foram marcados pelo PAS com a mesma intensidade em comparação com o controle (Fig. 27A) e expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27D) e 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27G) de fipronil.

3.4.5.1.2. *Enócitos*

Os resultados indicaram que a síntese de carboidratos pelos enócitos não foi prejudicada pelas exposições ao fipronil e que a presença de glicogênio foi observada nas células de todos os tratamentos. Assim como os trofócitos, os enócitos do grupo controle (Fig. 27B) e grupos expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27E), 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27H) e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27L) foram marcados pelo PAS com a mesma intensidade, indicando presença do conteúdo citoplasmático de glicogênio. Os enócitos do grupo exposto a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27E) apresentaram intensidade de marcação pelo PAS similar aos do grupo controle (Fig. 27B). Os enócitos do grupo exposto a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27H) apresentaram a mesma intensidade de marcação pelo PAS em comparação aos enócitos do grupo controle (Fig. 27B) e expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27E). Os enócitos do grupo exposto a 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27L) apresentaram a mesma intensidade de marcação pelo PAS em relação aos enócitos

do grupo controle (Fig. 18B) e grupos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27E) e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27H) de fipronil.

3.4.5.1.3. *Células Pericárdicas*

Os resultados indicaram que a filtração da hemolinfa pelas células pericárdicas não foi prejudicada pelas exposições ao fipronil em *B. atratus*, e que o conteúdo de glicogênio foi observado nas células pericárdicas do controle e em todos os tratamentos analisados. As células pericárdicas do grupo controle (Fig. 27C) e grupos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27F), $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27I) e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27M) apresentaram conteúdo de carboidratos no citoplasma marcados com a mesma intensidade pelo PAS, assim como foi observado em trofócitos e enócitos. A hemolinfa apresenta diversas substâncias, incluindo carboidratos e, ao ser filtrada pelas células pericárdicas, é assimilada pelas células com os polissacarídeos, que são marcados pelo PAS no citoplasma celular. As células pericárdicas do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27F) apresentaram marcação pelo PAS similar aos do grupo controle (Fig. 27C). As células pericárdicas do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27I) foram marcadas pelo PAS com a mesma intensidade em comparação com as células do grupo controle (Fig. 27C) e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27F). As células pericárdicas do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27M) apresentaram marcação pelo PAS similar as células do grupo controle (Fig. 27C) e expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27F) e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 27I).

Figura 27 - PAS

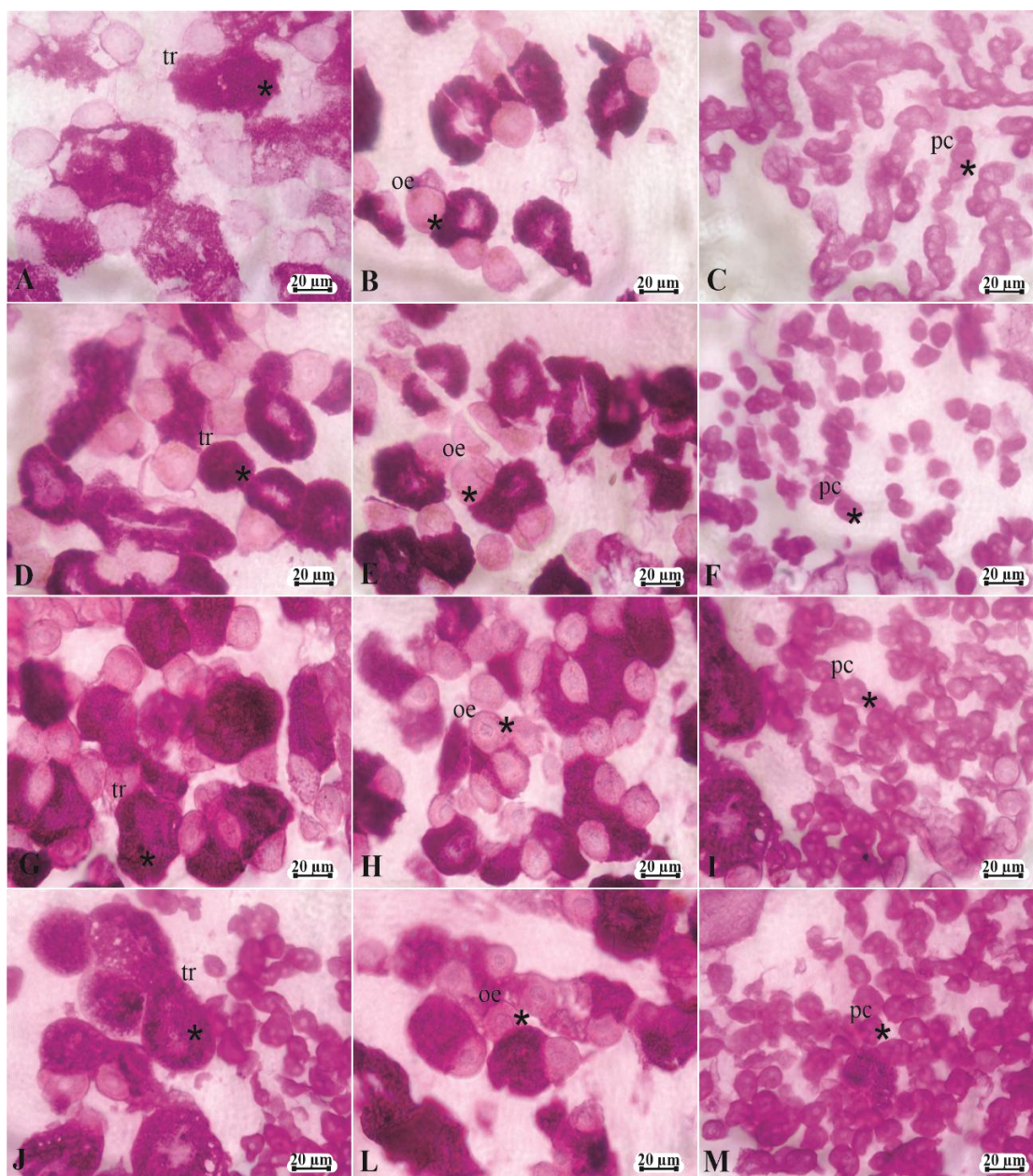


Figura 27 - Análise Histoquímica realizada por meio da técnica de coloração PAS das células do SHN de forrageiras de *B. atratus*. (A) Trofócitos grupo controle marcados pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (B) Enócitos do grupo controle com marcados pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (C) Células pericárdicas do grupo controle marcadas pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (D) Trofócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (E) Enócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (F) Células pericárdicas do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (G) Trofócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (H) Enócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (I) Células pericárdicas do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (J) Trofócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (L) Enócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma; (M) Células pericárdicas do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas pelo PAS indicando presença de glicogênio no citoplasma. **Legenda:** trofócito (tr), enócito (oe), célula pericárdica (pc). (*) indicam a presença de glicogênio no citoplasma das células. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.5.2. Azul de Bromofenol

3.4.5.2.1. Trofócitos

Os resultados apontaram possível disponibilização de proteínas dos trofócitos para outras células do organismo das abelhas conforme a crescente exposição ao fipronil. Os trofócitos do grupo controle (Fig. 28A) foram marcados pelo Azul de Bromofenol de forma intensa, indicando que o citoplasma apresentou conteúdo de grânulos proteicos. Os trofócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28D) apresentaram marcação pelo Azul de Bromofenol com menor intensidade em comparação com os do grupo controle (Fig. 28A). Os trofócitos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28G) apresentaram citoplasma com menor intensidade de marcação pelo Azul de Bromofenol em comparação aos trofócitos do grupo controle (Fig. 28A) e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28D). O mesmo padrão foi observado para os trofócitos expostos a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28J), apresentando menor intensidade de marcação pelo Azul de Bromofenol em comparação ao controle (Fig. 28A), aos trofócitos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28D) e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil (Fig. 28G).

3.4.5.2.2. Enócitos

Os resultados indicaram que, diferentemente dos trofócitos, não ocorreu variação do conteúdo de proteínas nos enócitos em relação às exposições ao fipronil. Os enócitos do grupo controle (Fig. 28B) e grupos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28E), $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28H) e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28L) foram marcados com a mesma intensidade pelo Azul de Bromofenol, indicando conteúdo citoplasmático de proteínas no controle e em todos os tratamentos avaliados. Os enócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28E) apresentaram intensidade de marcação pelo Azul de Bromofenol similar aos enócitos do grupo controle (Fig. 28B). Os enócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28H) apresentaram marcação pelo Azul de Bromofenol similar aos enócitos do grupo controle (Fig. 28B) e expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28E). Os enócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28L) apresentaram intensidade de marcação pelo Azul de Bromofenol similar aos enócitos do grupo controle (Fig. 28B) e expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28E) e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28H).

3.4.5.2.3. *Células Pericárdicas*

Os resultados indicaram que o conteúdo de proteínas presente na hemolinfa diminuiu mediante as crescentes concentração de exposição ao fipronil em *B. atratus*. As células pericárdicas apresentaram padrão de marcação pelo Azul de Bromofenol similar ao observado com os trofócitos. As células pericárdicas do grupo controle (Fig. 28C) foram marcadas pelo Azul de Bromofenol de forma intensa, indicando que o citoplasma apresentou conteúdo de proteínas. As células pericárdicas do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28F) apresentaram marcação pelo Azul de Bromofenol de forma menos intensa em relação ao controle (Fig. 28C). O mesmo padrão foi observado para as células pericárdicas expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28I), com marcação pelo Azul de Bromofenol com menor intensidade em relação as células pericárdicas do controle (Fig. 28C) e expostas a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil (Fig. 28F). As células pericárdicas expostas a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28M) foram marcadas com menor intensidade pelo Azul de Bromofenol em relação ao controle (Fig. 28C) e exposições a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28F) e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 28I).

Figura 28 - Azul de Bromofenol

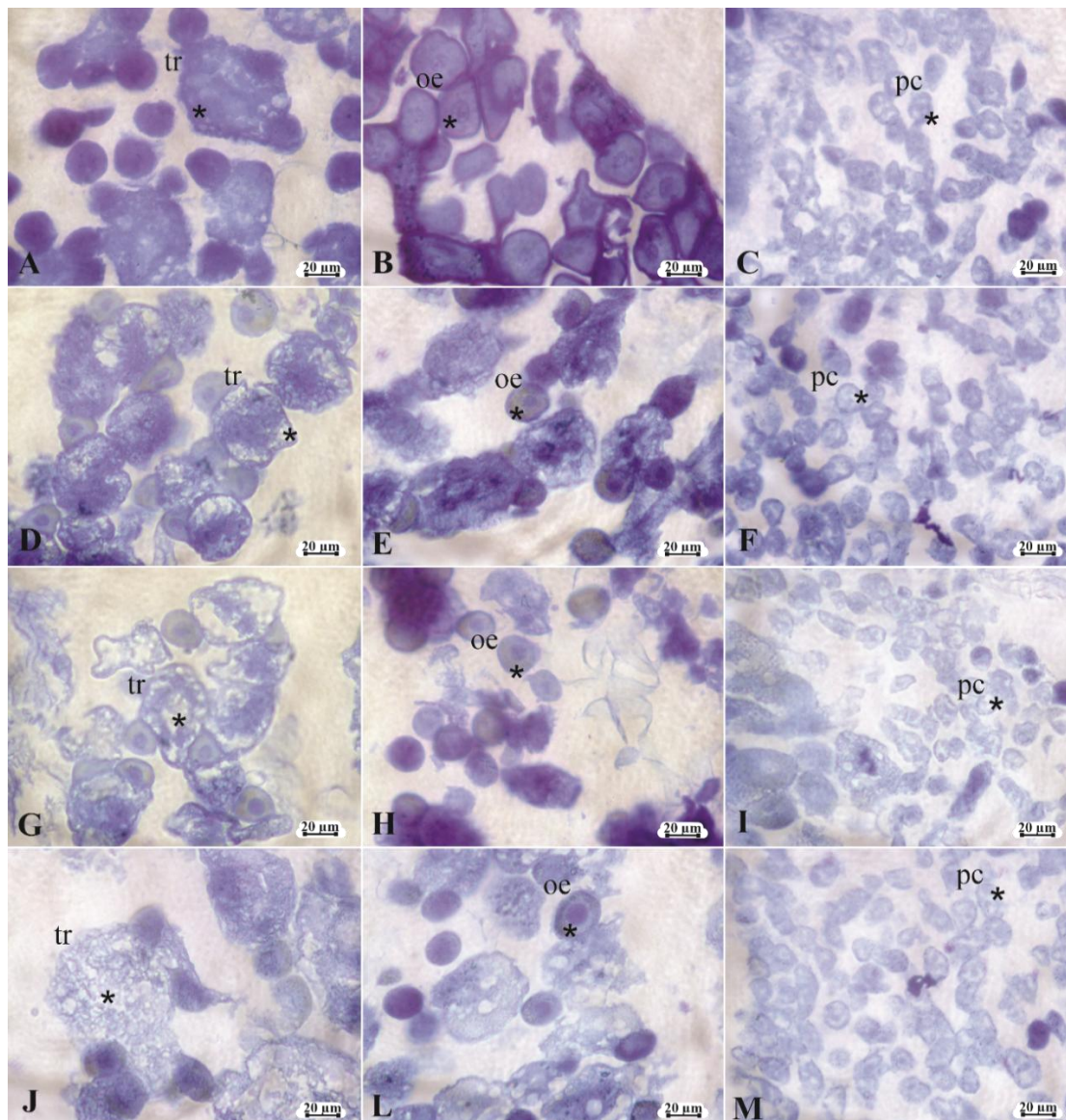


Figura 28 - Análise Histoquímica realizada por meio da técnica de coloração **Azul de Bromofenol** das células do SHN de forrageiras de *B. atratus*. (A) Trofócitos do grupo controle marcados pelo Azul de Bromofenol indicando presença de proteínas no citoplasma; (B) Enócitos do grupo controle marcados pelo Azul de Bromofenol indicando presença de proteínas no citoplasma; (C) Células pericárdicas do grupo controle marcadas pelo Azul de Bromofenol indicando presença de proteínas no citoplasma; (D) Trofócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados com menor intensidade pelo Azul de Bromofenol em relação ao controle; (E) Enócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Azul de Bromofenol indicando presença de proteínas no citoplasma; (F) Células pericárdicas do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas com menor intensidade pelo Azul de Bromofenol em relação ao controle; (G) Trofócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados com menor intensidade pelo Azul de Bromofenol em comparação ao controle e exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$; (H) Enócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Azul de Bromofenol indicando presença de proteínas no citoplasma; (I) Células pericárdicas do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas com menor intensidade pelo Azul de Bromofenol em comparação ao controle e exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$; (J) Trofócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados com menor intensidade pelo Azul de Bromofenol em comparação ao controle e exposições a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$; (L) Enócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Azul de Bromofenol indicando presença de proteínas no citoplasma; (M) Células pericárdicas do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas com menor intensidade pelo Azul de Bromofenol em comparação ao controle e exposições a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$. **Legenda:** trofócito (tr), enócito (oe), célula pericárdica (pc). (*) indicam a presença de proteínas no citoplasma das células. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.4.5.3. Sudan Black

3.4.5.3.1. *Trofócitos*

Os resultados indicaram que não ocorreu variação do conteúdo de triglicerídeos no citoplasma dos trofócitos dos grupos expostos ao fipronil e que as crescentes concentrações não influenciaram o conteúdo de lipídios nos trofócitos de *B. atratus*. Os trofócitos do grupo controle (Fig. 29A) e grupos expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29D), 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29G) e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29J) foram marcados com a mesma intensidade pelo Sudan Black, indicando que o citoplasma apresentou granulações de triglicerídeos em todos os tratamentos analisados. Os trofócitos do grupo exposto a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29D) foram marcados com a mesma intensidade pelo Sudan Black em comparação com os trofócitos do grupo controle (Fig. 29A). Os trofócitos do grupo exposto a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29G) foram marcados pelo Sudan Black com a mesma intensidade em comparação com os trofócitos do grupo controle (Fig. 29A) e expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29D). Os trofócitos do grupo exposto a 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29J) foram marcados com a mesma intensidade ao Sudan Black em relação aos trofócitos do grupo controle (Fig. 29A) e expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29D) e 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29G).

3.4.5.3.2. *Enócitos*

Os resultados indicaram que a presença do conteúdo de triglicerídeos no citoplasma dos enócitos não foi prejudicada pelas exposições ao fipronil em *B. atratus*. O citoplasma dos enócitos do grupo controle (Fig. 29B) e dos grupos expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29E), 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29H) e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29L) foram marcados com a mesma intensidade pelo Sudan Black. Os enócitos do grupo exposto a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29E) apresentaram marcação pelo Sudan Black com intensidade similar aos enócitos do grupo controle (Fig. 29B). Os enócitos do grupo exposto a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29H) foram marcados pelo Sudan Black com a mesma intensidade em relação aos enócitos do grupo controle (Fig. 29B) e expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29E). Os enócitos do grupo exposto a 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29L) foram marcados pelo Sudan Black com a mesma intensidade em relação aos enócitos do grupo controle (Fig. 29B) e expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29E) e 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29H) de fipronil.

3.4.5.3.3. Células Pericárdicas

Os resultados indicaram que as crescentes concentrações às exposições ao fipronil não alteraram o conteúdo de triglicérides na hemolinfa em *B. atratus* mediante atividade pinocítica das células pericárdicas, evidenciado pela marcação ao Sudan Black. O citoplasma das células pericárdicas apresentou o mesmo padrão em relação a presença de lipídios observados em trofócitos e enócitos. O grupo controle (Fig. 29C), assim como os grupos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29F), $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29I) e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29M) de fipronil, apresentaram conteúdo citoplasmático marcados com a mesma intensidade pelo Sudan Black. As células pericárdicas do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29F) apresentou a mesma intensidade de marcação pelo Sudan Black em relação ao controle (Fig. 29C). As células pericárdicas do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29I) apresentaram a mesma intensidade de marcação pelo Sudan Black em relação as células pericárdicas do controle (Fig. 29C) e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29F). As células pericárdicas expostas a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29M) foram marcadas pelo Sudan Black com a mesma intensidade em relação as células do controle (Fig. 29C) e grupos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29F) e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Fig. 29I).

Figura 29 - Sudan Black

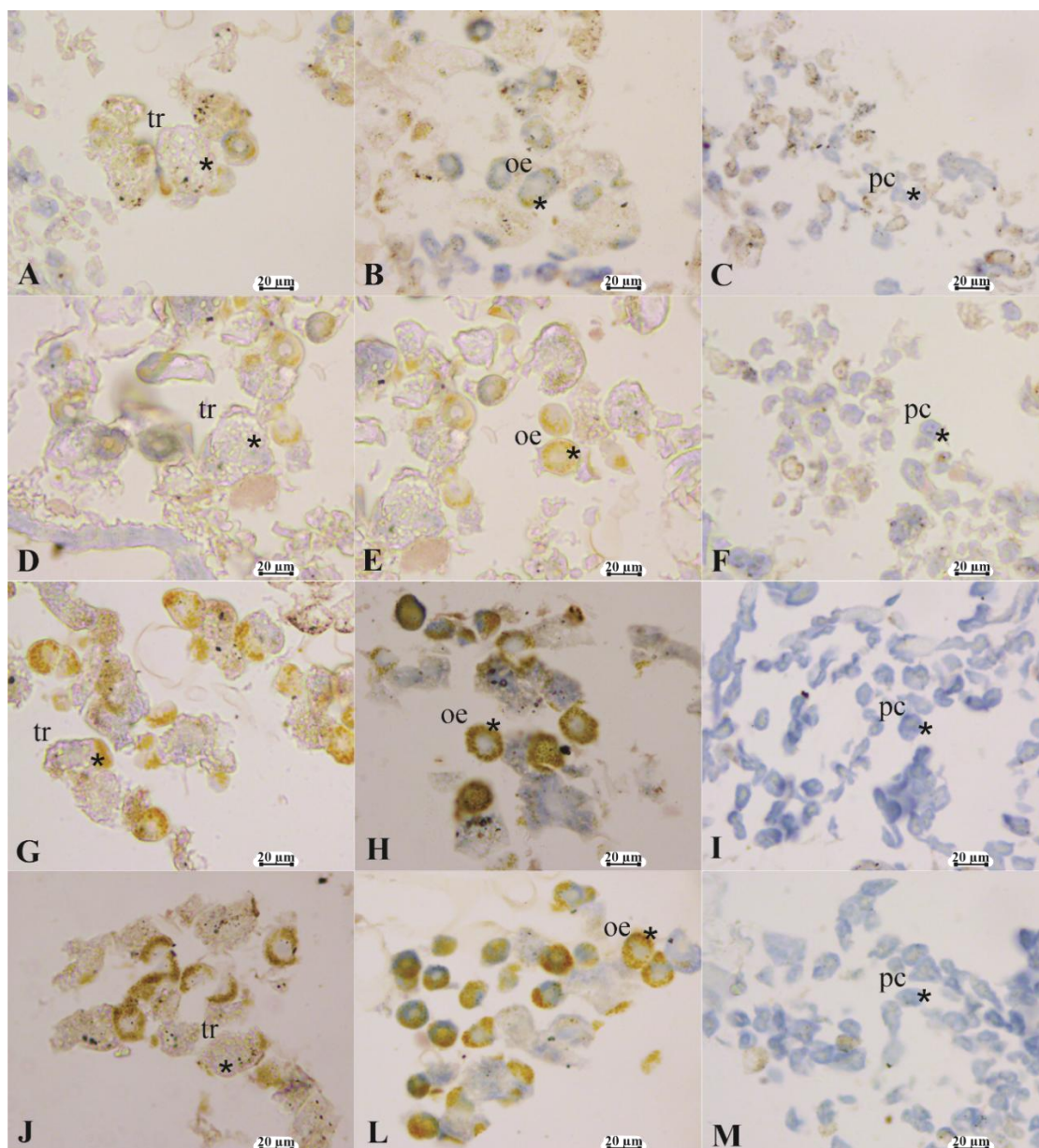


Figura 29 - Análise Histoquímica realizada por meio da técnica de coloração **Sudan Black** das células do SHN de forrageiras de *B. atratus*. (A) Trofócitos do grupo controle marcados pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (B) Enócitos do grupo controle marcados pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (C) Células pericárdicas do grupo controle marcadas pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (D) Trofócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (E) Enócitos do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (F) Células pericárdicas do grupo exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (G) Trofócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (H) Enócitos do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (I) Células pericárdicas do grupo exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (J) Trofócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (L) Enócitos do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcados pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma; (M) Células pericárdicas do grupo exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ marcadas pelo Sudan Black indicando presença de triglicerídeos no citoplasma. **Legenda:** trofócito (tr), enócito (oe), célula pericárdica (pc); (*) indicam a presença de triglicerídeos no citoplasma das células. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

3.5. DISCUSSÃO

Algumas espécies de abelhas do gênero *Bombus* são nativas do território brasileiro e essenciais para polinização de espécies de plantas nativas, garantindo a manutenção da variabilidade genética e a biodiversidade de plantas nos biomas brasileiros. A polinização realizada por essas abelhas também resulta em melhoria da qualidade e quantidade dos frutos (Fijen *et al.*, 2018; Yankit *et al.*, 2018). A inclusão dessas abelhas em produções agrícolas resulta em aumentos de produção e diminuição da necessidade de aplicação de fertilizantes e pesticidas (Macinnis; Forrest, 2020). Portanto, fica clara a importância econômica e ecossistêmica dessas abelhas para a manutenção dos biomas brasileiros. Associado ao seu valor, também é conhecido e relatado o declínio de populações de espécies de abelhas nativas, sobretudo devido ao efeito de agroquímicos amplamente utilizados em sistemas agrícolas, como o fipronil. A atual pesquisa trouxe muitas contribuições para área relacionada com estudos ecotoxicológicos de abelhas do gênero *Bombus*, pois apresenta resultados inéditos sobre os efeitos do fipronil sobre as células do SHN. As análises efetuadas na pesquisa apontam um panorama detalhado sobre a atuação de concentrações observadas em campo de fipronil sobre *B. atratus*, o que evidencia os danos celulares e, conseqüentemente, prejudica a aptidão desses animais. A pesquisa é imprescindível para tentativa de racionalização do uso de agrotóxicos, e reforça a necessidade e importância da conservação das espécies de abelhas nativas, dentre elas, as do gênero *Bombus*.

Os efeitos subletais dos pesticidas podem comprometer funções fisiológicas, que associados a outros estressores ambientais, podem aumentar danos celulares observados no organismo das abelhas (Tadei *et al.*, 2024). Embora a utilização do fipronil por meio da pulverização tenha sido recentemente vetada em território nacional, por muitos anos este agrotóxico foi largamente utilizado e seus efeitos foram responsáveis por diversos impactos ambientais, sobretudo impactando populações de polinizadores. A atual pesquisa enfatiza que mais estudos sobre efeitos toxicológicos de mais agrotóxicos sobre espécies de abelhas nativas necessitam ser realizados para melhor compreensão da amplitude dos danos ambientais e dos efeitos sobre populações de abelhas. Nesse contexto, a análise das células do SHN forneceu resultados de grande relevância sobre os efeitos da ação do fipronil sobre forrageiras de *B. atratus*. A atual pesquisa estabelece relação e faz comparações com os resultados obtidos com os resultados de diversas pesquisas encontradas na literatura.

Os resultados da análise morfológica indicaram que os efeitos subletais do fipronil impactaram trofócitos, enócitos e células pericárdicas em todas as concentrações (1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$). Os resultados indicaram que os danos celulares foram ainda maiores nas exposições a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$. A análise morfológica deixou claro que as estruturas do núcleo e citoplasma foram muito danificadas pela ação do fipronil. Os resultados da exposição a 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil sobre as células do SHN foram similares as exposições ao cádmio (Abdalla; Domingues, 2015) e mercúrio (Nogueira *et al.*, 2019), indicando a alta toxicidade do fipronil para as abelhas nativas do gênero *Bombus*.

A análise morfológica do grupo controle indicou que trofócitos, enócitos e células pericárdicas estavam desempenhando normalmente suas funções e não foram observados danos celulares, com núcleos e citoplasma intactos e sem danos estruturais. As células pericárdicas apresentaram baixa atividade pinocítica de filtração da hemolinfa, estágio I de ativação, padrão observado em tecidos saudáveis (Abdalla; Domingues, 2015). Portanto, os resultados do grupo controle demonstraram que não foram observados danos celulares nas células das abelhas coletadas no entorno do *campus* da universidade, onde as abelhas foram coletadas. A análise do grupo controle permitiu concluir que, embora a área de entorno apresentasse atividades agrícolas, as abelhas não foram intoxicadas durante os meses de coleta.

A exposição a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ demonstrou que o fipronil causou indícios de danos estruturais nas células do SHN. Os núcleos dos trofócitos perderam seu formato ramificado com cromatina compactada, indicando princípio de danos estruturais sobre o material genético. Em relação ao citoplasma, as observações indicaram que os trofócitos mantiveram a capacidade de armazenar substâncias devido as granulações observadas. Os resultados da exposição a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil indicaram início de degeneração de estruturas celulares, o que poderia evoluir para um processo de morte celular caso o período de exposição fosse prolongado. Os trofócitos expostos a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram as mesmas características da exposição a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, porém com danos celulares mais acentuados. Os núcleos não apresentaram as ramificações características dos trofócitos e o citoplasma vacuolizado apresentou poucas granulações em relação ao controle. Os resultados indicaram que o material genético possivelmente foi afetado pela ação do fipronil, com comprometimento da capacidade celular no armazenamento e mobilidade de moléculas em razão dos danos observados no citoplasma. Os resultados da exposição a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ indicaram colapso dos trofócitos e comprometimento de sua funcionalidade.

A exposição a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ demonstrou que os trofócitos apresentaram as mesmas injúrias observadas em $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$, com o agravante de maior intensidade. Os núcleos mais uma vez apresentaram forma atípica e citoplasma vacuolizado e com poucas granulações, indicando perda da capacidade em realizar sua função de armazenar substâncias. Os resultados das exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ indicaram o colapso dos trofócitos. Uma vez que a hemolinfa passa primeiro pelas células do corpo gorduroso e depois pelas células pericárdicas antes de acessar o vaso dorsal (Abdalla; Domingues, 2015), os trofócitos e enócitos são as primeiras células do SHN a serem impactadas pelo fipronil. Caso ocorresse colapso dos trofócitos, a composição do meio circundante dos insetos e as atividades metabólicas seriam diretamente impactadas, uma vez que a capacidade de síntese e armazenamento de substâncias seriam prejudicadas (Kovalskyi; Zhmur, 2024). O colapso das células do corpo gorduroso foi observado nas exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, evidenciando a toxicidade do fipronil para *B. atratus*.

Os enócitos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil mantiveram a forma característica das células e dos núcleos, com formatos arredondados. Entretanto, foram observados indícios de condensação da cromatina e picnose celular, cenário que poderia evoluir para morte celular caso fosse prolongado o tempo de exposição. A exposição a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ causou danos celulares mais intensos em relação a exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$. Os enócitos apresentaram cromatina condensada, indicando colapso celular. Em relação a exposição a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, os enócitos apresentaram danos celulares mais intensos em relação as demais exposições. Os enócitos perderam o formato esférico celular característico, apresentando forma poligonal, enquanto e os núcleos apresentaram cromatina muito compactada. Os resultados indicaram colapso das estruturas e funções celulares dos enócitos. Como essas células estão relacionadas com a síntese de substâncias constituintes da epicutícula dos insetos (Lu *et al.*, 2021) e de processos envolvendo a desintoxicação e regulação da composição da hemolinfa (Hsu; Weng, 2021), o colapso celular poderia comprometer diversas atividades fisiológicas no organismo das abelhas expostas ao fipronil. Os efeitos do colapso dos enócitos poderia estar relacionado com prejuízos sobre a aptidão das abelhas, análise que não foi realizada pela pesquisa, mas com indicativo de ocorrência fornecida pela análise morfológica.

As células pericárdicas expostas a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ foram encontradas em estágio II de ativação, com visível aumento do tamanho celular devido ao início de formação de pequenos vacúolos no citoplasma. Os resultados indicaram que a exposição ativou o

mecanismo de filtração da hemolinfa. As células pericárdicas expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram aumento da vacuolização do citoplasma, classificadas em estágios II e III de ativação pela observação da fusão de vacúolos citoplasmáticos. Os mesmos resultados foram observados na exposição a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil, indicando aumento da atividade pinocítica da hemolinfa para neutralização de substâncias tóxicas. De acordo com Abdalla e Domingues (2015), as células do SHN respondem de forma sincronizada em relação a exposição a substâncias tóxicas. Primeiro as células do corpo gorduroso colapsam, o que pode ser observado em todas as concentrações de fipronil analisadas, e em seguida as células pericárdicas são ativadas, alcançando os estágios III ou IV de ativação. Na atual pesquisa, o estágio de III de ativação foi observado pelas células pericárdicas expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil, indicativo de que as células do corpo gorduroso estavam em processo de colapso celular. O estágio IV de ativação é caracterizado pela fusão de muitos vacúolos citoplasmáticos no centro da célula, deslocando o núcleo para a periferia do citoplasma. O estágio IV de ativação está relacionado com a capacidade máxima de absorção da hemolinfa e com a ruptura da parede muscular do vaso dorsal, causando a morte das abelhas (Abdalla; Domingues, 2015). O estágio IV de ativação das células pericárdicas não foi observado na atual pesquisa. No entanto, o estágio II e III de ativação caracterizam efeitos subletais do fipronil sobre o organismo das abelhas.

Os danos celulares observados sobre as células do SHN repetem-se em diversas pesquisas envolvendo a exposição a doses subletais de agrotóxicos. Independente da substância química e da espécie de abelha analisada, caso ocorra toxicidade, os danos estruturais celulares muitas vezes são similares. O trabalho realizado por Abdalla e Domingues (2015) utilizou as células do SHN de *B. morio* para avaliação da dose subletal de $1 \mu\text{L L}^{-1}$ de cloreto de cádmio. A pesquisa trouxe grandes contribuições para estudos relacionados com efeitos subletais de agrotóxicos sobre as células das abelhas nativas. As exposições foram realizadas por meio de doses considerada ambientalmente segura pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente no Brasil (CONAMA) para águas de classes I e II. Os pesquisadores argumentaram que o cádmio provocou ativação das células pericárdicas em estágio IV, ou seja, capacidade máxima de absorção da hemolinfa. Os enócitos apresentaram colapso celular, com cromatina fragmentada e compactada, assim como os trofócitos. Os resultados observados nas células do corpo gorduroso em *B. atratus* da atual pesquisa foram similares aos observados por Abdalla e Domingues (2015), embora a exposição a metais-traço comumente apresente grande toxicidade para

os polinizadores, mesmo em doses subletais (Nogueira *et al.*, 2019). Os resultados entre as duas pesquisas foram compatíveis e evidenciaram a grande toxicidade de doses subletais dos agrotóxicos para as células do corpo gorduroso, assim como para o organismo das abelhas nativas do gênero *Bombus*.

A atual pesquisa estabeleceu uma relação com os resultados obtidos na pesquisa realizada por Tadei *et al.* (2024), que analisaram os efeitos letais e subletais da acetamiprida e azoxistrobina em abelhas nativas da espécie *Centris analis*. Os pesquisadores demonstraram os danos causados às células do SHN de *C. analis*. A exposição à azoxistrobina não afetou a sobrevivência das abelhas, enquanto a exposição a acetamiprida demonstrou efeitos subletais em fêmeas e letais para os machos. A morfometria das células do SHN dos machos expostos à acetamiprida revelou enócitos com áreas superficiais menores em relação ao controle, assim como os enócitos de *B. atratus* expostos a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Na pesquisa de Tadei *et al.* (2024), os enócitos expostos somente à acetamiprida e à associação de acetamiprida e azoxistrobina apresentaram vacuolização citoplasmática e não foi observado fragmentação da cromatina. Na atual pesquisa, os enócitos de *B. atratus* expostos ao fipronil em todos os grupos expostos apresentaram compactação da cromatina, mas sem vacúolos no citoplasma. Na pesquisa de Tadei *et al.* (2024), os trofócitos dos machos expostos aos agrotóxicos apresentaram núcleos atípicos, assim como os trofócitos de *B. atratus* expostos ao fipronil em todas as concentrações analisadas (1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$). As células pericárdicas de *B. atratus* expostas ao fipronil apresentaram estágios de ativação II e III nas exposições a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, enquanto os machos de *C. analis* expostos a acetamiprida apresentaram células pericárdicas em estágio IV de ativação, o que possivelmente foi a causa do alto índice de mortalidade nesses indivíduos. As células pericárdicas das fêmeas expostas à acetamiprida e azoxistrobina foram observadas em estágio II de ativação, com efeitos mais brandos em relação aos machos, assim como na exposição de *B. atratus* a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Tadei *et al.* (2024) argumentaram que a rápida metabolização da acetamiprida observada nas fêmeas de *C. analis* poderia ocorrer principalmente pela atuação das células pericárdicas e dos enócitos, o que reduziu os efeitos toxicológicos dos agrotóxicos. A atual pesquisa não analisou a diferença de sensibilidade entre os sexos em *B. atratus*, mas observou resultados semelhantes em relação às células pericárdicas e trofócitos expostos a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil em comparação com machos de *C. analis*. Portanto, a

concentração da substância e a sensibilidade da espécie são determinantes para sobrevivência das abelhas expostas aos agrotóxicos, assim como a ação das células do SHN, reforçando sua importância para o organismo dos insetos como a primeira linha de barreira contra substâncias tóxicas (Abdalla; Domingues, 2015; Tadei *et al.*, 2024).

Resultados similares aos de *B. atratus* foram observados por Assis *et al.* (2022), que avaliaram o efeito de doses subletais de imidacloprida e piraclostrobina sobre as células do corpo gorduroso de abelhas solitárias da espécie *Tetrapedia diversipes*. Assim como *B. atratus* expostas ao fipronil, não ocorreu letalidade em *T. diversipes* expostas aos agrotóxicos. A análise morfológica das exposições a imidacloprida revelou enócitos atípicos, com vacúolos no citoplasma e núcleos com cromatina compactada e fragmentada, enquanto os trofócitos apresentaram marginalização da cromatina. Os indivíduos expostos a piraclostrobina também apresentaram enócitos morfológicamente atípicos, com tamanho reduzido e compactação da cromatina. Os trofócitos apresentaram vacúolos citoplasmáticos e poucos grânulos proteicos no citoplasma, além de núcleos compactados. No tratamento envolvendo a exposição aos dois toxicantes, imidacloprida e piraclostrobina, trofócitos e enócitos apresentaram morfologia atípica, fragmentação da cromatina e vacuolização do citoplasma. Os resultados foram similares às exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil nas células do corpo gorduroso de *B. atratus*, o que indica os mesmos danos a estruturas celulares, mesmo com a utilização de diferentes toxicantes e espécies de abelhas. Danos sobre as células do corpo gorduroso podem comprometer a síntese de carboidratos, proteínas, lipídios (Lu *et al.*, 2021) e processos de desintoxicação das abelhas (Brejcha *et al.*, 2023). O trabalho de Assis *et al.* (2022) concluiu que a aptidão das abelhas da espécie *T. diversipes* possivelmente foi prejudicada pelas doses subletais de imidacloprida e piraclostrobina. Mesmo não causando mortalidade significativa, os agrotóxicos poderiam contribuir para o declínio de populações da espécie. A mesma conclusão pode ser atribuída a *B. atratus* mediante os resultados observados nas células do corpo gorduroso.

A atual pesquisa verificou resultados similares entre as células do corpo gorduroso de *B. atratus* expostas a doses subletais de fipronil com *A. mellifera* expostas ao tiametoxan. O trabalho realizado por Bálsamo *et al.* (2020) analisou o efeito da associação de doses subletais de tiametoxan na concentração de 0,0856 ng e 0,00856 ng por abelha em associação com o microsporídeo *Nosema ceranae* sobre as células do HNS de *A. mellifera*. Microsporídios são fungos parasitas intracelulares obrigatórios que podem

infectar diversos grupos biológicos, como peixes, mamíferos e artrópodes (Fadhilah; Gabbar; Bokhari, 2023). Os trofócitos expostos a 0,00856 ng não apresentaram muitos vacúolos citoplasmáticos, mas os núcleos perderam o formato ramificado característico. Os trofócitos expostos a 0,0856 ng apresentaram vacuolização citoplasmática, núcleos sem o contorno ramificado característico e cromatina condensada. A exposição aos agrotóxicos realizada de forma associada com o parasita *N. ceranae*, mesmo em 0,00856 ng, os trofócitos apresentaram citoplasma vacuolizado e com total perda de sua morfologia característica. Os trofócitos expostos a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil de *B. atratus* demonstraram injúrias celulares mais brandas em comparação com concentrações mais altas de fipronil, similares aos resultados observados em trofócitos de *A. mellifera* expostas a 0,00856 ng (Bálsamo *et al.*, 2020). Da mesma forma, as exposições a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil em *B. atratus* causaram uma resposta similar nas células do HNS de *A. mellifera* expostas a 0,0856 ng e 0,00856 ng de tiametoxan associado com *N. ceranae*. Mais uma vez os efeitos causados sobre as células do HNS foram correspondentes, com capacidade para possivelmente prejudicar o metabolismo intermediário, armazenamento de substâncias e processos relacionados com a desintoxicação de substâncias tóxicas no organismo dos polinizadores (Haas *et al.*, 2022; Kovalskyi; Zhmur, 2024).

Os resultados da ação do fipronil sobre os enócitos na atual pesquisa divergiram dos resultados obtidos na pesquisa realizada por Carneiro *et al.* (2023). Os pesquisadores avaliaram os efeitos da exposição subletal a 0,7 ng/mL de imidacloprida sobre as células do intestino médio e do corpo gorduroso de larvas de *A. mellifera* expostas durante seis dias. Os resultados da análise morfológica do corpo gorduroso demonstraram que os enócitos das larvas do grupo exposto não apresentaram danos celulares em comparação ao controle. O resultado divergiu dos resultados de Assis *et al.* (2022), que observaram alterações nos enócitos em *T. diversipes* expostas a imidacloprida, como vacuolização do citoplasma e fragmentação nuclear. O mesmo foi observado com os enócitos de *B. atratus* expostas a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Os resultados das pesquisas trouxeram importantes contribuições para evidenciar a maior suscetibilidade das abelhas nativas em comparação com *A. mellifera*, embora as Avaliações de Risco das formulações comerciais dos agrotóxicos utilizam as abelhas melíferas como espécie modelo, negligenciando as espécies de polinizadores nativos (Sgolastra *et al.*, 2020).

O trabalho de Farder-Gomes *et al.* (2024) avaliou os efeitos subletais da imidacloprida, piraclostrobina e glifosato sobre as células do corpo gorduroso de *Scaptotrigona postica*. Os enócitos das abelhas expostas a todos os grupos de agrotóxicos analisados, de forma individual ou em associação, apresentaram vacúolos citoplasmáticos, núcleos periféricos e células com forma atípica. A exposição a piraclostrobina foi menos prejudicial em relação às exposições a imidacloprida e ao glifosato. Os trofócitos apresentaram formas atípicas, presença de muitos grânulos citoplasmáticos e núcleo sem as ramificações características. Os pesquisadores argumentaram que os resultados indicaram morte celular devido a alterações morfológicas das células do corpo gorduroso. Os resultados corresponderam com os observados em *B. atratus* expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Dentre outros efeitos, os agrotóxicos induzem o estresse oxidativo por meio da formação de radicais livres (Sule; Condon; Gomes, 2022), que atuam em todo organismo das abelhas, incluindo o corpo gorduroso (Farder-Gomes *et al.*, 2024). Os resultados da pesquisa de Farder-Gomes *et al.* (2024) indicaram possíveis danos para a síntese, armazenamento e neutralização de substâncias tóxicas no organismo de *S. postica*, assim como poderia ocorrer em *B. atratus*.

Além do SHN, o fipronil pode prejudicar células de outros órgãos no organismo das abelhas. Algumas pesquisas analisaram a toxicidade de doses subletais de fipronil para as células do intestino médio (Farder-Gomes *et al.*, 2021) e túbulos de Malpighi (Farder-Gomes *et al.*, 2022) de abelhas nativas sem ferrão da espécie *Partamona helleri*. Os resultados indicaram toxicidade do fipronil, possivelmente prejudicando a absorção de nutrientes e filtração da hemolinfa (Harwood; Amdam, 2021). Os resultados são importantes por revelar que células de outros órgãos também podem ser afetadas pelos efeitos subletais do fipronil. Embora o SHN seja imprescindível para neutralização de substâncias e fornecer proteção ao organismo das abelhas, dependendo da concentração do agrotóxico e da sensibilidade da espécie, as células do SHN podem entrar em colapso e não evitar a ação sistêmica dos agrotóxicos (Abdalla; Domingues, 2015).

O efeito da exposição ao fipronil foi similar aos observados por Inoue *et al.* (2022) no trabalho que avaliou a exposição de doses subletais do fungicida piraclostrobina sobre as células do SHN de *A. mellifera*. Os enócitos das abelhas melíferas perderam a forma esférica característica, com vacuolização citoplasmáticas e núcleos com cromatina condensada. Os trofócitos perderam a forma poligonal típica, os núcleos perderam as

ramificações, com cromatina compactada e citoplasma vacuolizado. Os resultados das exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil corresponderam aos obtidos por Inoue *et al.* (2022), com exceção da vacuolização citoplasmática dos enócitos. Assim, o efeito da exposição aos agrotóxicos poderia prejudicar o metabolismo intermediário e processos relacionados com a desintoxicação de substâncias, tanto em *B. atratus* expostas ao fipronil como em *A. mellifera* expostas a piraclostrobina (Hsu; Weng, 2021; Inoue *et al.*, 2022; Kovalskyi; Zhmur, 2024). Em relação aos danos morfológicos observados sobre as células pericárdicas, *A. mellifera* expostas a piraclostrobina apresentaram núcleos picnóticos e vacúolos citoplasmáticos, classificadas em estágio III e IV de ativação (Inoue *et al.*, 2022). A piraclostrobina causou colapso das células pericárdicas devido ao estágio IV de ativação em *A. mellifera*, o que não ocorreu nas exposições de fipronil em *B. atratus*. Existe uma diferença de sensibilidade aos agrotóxicos entre *A. mellifera* e as abelhas do gênero *Bombus*, de forma que as concentrações analisadas por Inoue *et al.* (2022) em *A. mellifera* poderiam causar danos mais severos para as células pericárdicas de *B. atratus*. A análise das células do SHN foi eficiente e representou mais uma vez uma importante ferramenta para avaliar os efeitos subletais de agrotóxicos em diferentes espécies de abelhas.

Os resultados das pesquisas intensificam a preocupação sobre a conservação de espécies de abelhas nativas e a conscientização para o risco de extinção local dessas abelhas no ambiente natural. O resultado da atual pesquisa demonstrou que os efeitos causados pela ação do fipronil sobre as células do SHN podem prejudicar o organismo das abelhas do gênero *Bombus*. No entanto, o efeito toxicológico de concentrações subletais de metais-traço são mais prejudiciais para as abelhas do gênero *Bombus*. A pesquisa de Nogueira *et al.* (2019) avaliou o efeito subletal do mercúrio ($0,2 \mu\text{L L}^{-1}$) sobre as células do HNS de *B. morio* e *B. atratus*. A concentração utilizada foi considerada ambientalmente segura pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente no Brasil (CONAMA) para águas de classe 1, 2 e 3. O núcleo dos trofócitos de ambas as espécies perderam a forma ramificada característica e apresentaram cromatina compactada e fragmentada. O colapso dos trofócitos indicou que o processo de tradução entre núcleo e o citoplasma poderia ser prejudicado, o que possivelmente levou ao comprometimento do metabolismo intermediário no organismo das abelhas (Abdalla; Domingues, 2015; Nogueira *et al.*, 2019). Em relação aos enócitos, as células perderam a forma esférica característica e apresentaram núcleos picnóticos em ambas as espécies. No entanto, os

efeitos da exposição ao mercúrio foram mais prejudiciais para *B. atratus*, em que os enócitos formaram uma massa celular indistinguível, impossibilitando inclusive a distinção entre as mesmas. Os resultados indicaram que as funções celulares desempenhadas pelos enócitos, como síntese de substâncias e processos de desintoxicação foram prejudicados pela ao mercúrio (Darragh; Nelson; Ramírez, 2021; Haas *et al.*, 2022). O mesmo pode ser interpretado na atual pesquisa com a exposição ao fipronil, que desencadeou danos similares, mas de menor magnitude em comparação com o mercúrio. Nogueira *et al.* (2019) evidenciaram a enorme toxicidade de metais-traço para as abelhas nativas, mesmo em concentração traço. Na atual pesquisa, os enócitos não chegaram a formar uma massa indistinguível de células, mas também foram impactados pela ação do fipronil, evidenciando sua ação sobre o organismo das abelhas do gênero *Bombus*. Assim, os resultados foram similares, indicando a suscetibilidade das abelhas nativas expostas a concentrações subletais de agrotóxicos.

As células pericárdicas de *B. atratus* e *B. morio* analisadas na pesquisa de Nogueira *et al.* (2019) apresentaram morte celular, com a observação de condensação e fragmentação da cromatina e estágio IV de ativação. Esse estágio compromete a distribuição de nutrientes e hormônios entre os órgãos das abelhas, uma vez que ocorre diminuição generalizada de nutrientes na hemolinfa (Abdalla; Domingues, 2015; Domingues *et al.*, 2017). O estágio IV de ativação não foi observado nas exposições ao fipronil, indicando que o contaminante não apresentou o mesmo nível de toxicidade do mercúrio. O colapso das células do SHN demonstrou a capacidade dos efeitos subletais do mercúrio em prejudicar outros órgãos no organismo das abelhas nativas do gênero *Bombus*, uma vez que o toxicante não foi neutralizado pelas células do SHN (Nogueira *et al.*, 2019). Os pesquisadores também concluíram que a espécie *B. atratus* foi suscetível em relação a *B. morio*, demonstrando que pode ocorrer variação interespecífica da sensibilidade a exposição agrotóxicos entre diferentes espécies, mesmo que sejam filogeneticamente próximas.

A atual pesquisa demonstrou que as exposições ao fipronil apresentaram capacidade para possivelmente prejudicar o metabolismo intermediário, as atividades antioxidantes de enzimas relacionadas a neutralização de substâncias tóxicas e a resposta imunológica das abelhas (Domingues *et al.*, 2017; Bálsamo *et al.*, 2020). Os resultados da análise morfométrica comprovaram os efeitos subletais da ação do fipronil por meio da alteração da área superficial das células do HNS de *B. atratus*. A medida em que as

concentrações da exposição ao fipronil aumentaram, danos celulares causaram diminuição da área superficial das células do corpo gorduroso e aumento da área das células pericárdicas (tabela 1). Os resultados da análise morfométrica indicaram que as exposições ao fipronil causaram danos às estruturas celulares de trofócitos e enócitos em todas as concentrações analisadas. Assim como observado na análise morfológica, os danos foram mais significativos para as células do corpo gorduroso dos indivíduos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Trofócitos e enócitos não apresentaram diferença da alteração da área celular entre controle e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, indicando efeitos mais brandos em comparação com as exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$. Também não houve diferença da área celular entre as exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, indicando que a intensidade dos danos celulares causados pelo fipronil não diferiram entre essas duas concentrações. Os resultados indicaram que a funcionalidade das células do corpo gorduroso em sintetizar e armazenar substâncias foi prejudicada, principalmente em células expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021; Stec; Saleem; Darveau, 2021; Kovalskyi; Zhmur, 2024).

As células pericárdicas não apresentaram o mesmo padrão de variação da área superficial celular observado com as células do corpo gorduroso. Conforme as concentrações de fipronil aumentavam, a atividade pinocítica realizada pelas células pericárdicas também aumentavam, a fim de filtrar a hemolinfa e neutralizar substâncias tóxicas. A atividade pinocítica é responsável pela vacuolização observada no citoplasma das células pericárdicas. À medida que as abelhas eram expostas a doses maiores de fipronil, mais intensa era a atividade pinocítica e mais vacúolos eram formados no citoplasma dessas células (Abdalla; Domingues, 2015). A fusão dos vacúolos no citoplasma levou a um aumento da área celular, que pode ser identificado por meio da medição da área superficial das células pericárdicas na análise morfométrica. Os resultados indicaram intensa atividade das células pericárdicas dos grupos expostos a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Não houve diferença da área superficial celular entre os grupos expostos ($1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$). A análise morfológica indicou que as células pericárdicas expostas a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram estágios II de ativação, enquanto as células expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram estágios II e III de ativação. Os estágios de ativação alcançados pela atividade pinocítica das células pericárdicas puderam ser comprovados por meio da análise morfométrica. Os estágios de ativação observados indicaram o colapso das células

do corpo gorduroso e que a exposição prolongada ao fipronil também poderia levar ao colapso das células pericárdicas (Abdalla; Domingues, 2015).

Os resultados da análise morfométrica das células do corpo gorduroso na atual pesquisa foram compatíveis com os obtidos em diversas pesquisas. Quando ocorre injúrias das estruturas celulares devido à ação de substâncias tóxicas, as células do corpo gorduroso comumente apresentam diminuição da área superficial, um indicativo de prejudicar estruturas e a funcionalidade das células. Viotti *et al.* (2021) realizaram análise morfométrica das células do corpo gorduroso em larvas de *A. mellifera* expostas a secreções tóxicas de *Epormenis cestri*. Os pesquisadores concluíram que os enócitos do grupo exposto apresentaram cromatina compactada e perda do formato circular característico dos núcleos das células. A análise morfométrica indicou que os enócitos do grupo exposto eram menores em relação ao controle. Os trofócitos do grupo exposto não apresentaram limites celulares distinguíveis entre as células e vacúolos lipídicos citoplasmáticos menores ou ausentes em relação ao controle. De maneira similar aos resultados observados com os enócitos, os trofócitos do grupo exposto eram menores em relação ao controle. Os pesquisadores concluíram que as células do corpo gorduroso das larvas de *A. mellifera* expostas ao contaminante estavam em processo de apoptose, prejudicando taxas metabólicas e causando danos a estruturas celulares. As mesmas conclusões foram obtidas na atual pesquisa pelas exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil sobre as células do corpo gorduroso de *B. atratus*.

Um padrão similar em relação a análise morfométrica de células do SHN foi observado em diversas pesquisas com *A. mellifera* expostas a agrotóxicos. O trabalho desenvolvido por Inoue *et al.* (2022) realizou análise morfométrica dos enócitos de *A. mellifera* expostas a doses subletais de piraclostrobina. A medição da área dos enócitos foi um importante parâmetro para indicar a resposta toxicológica no organismo das abelhas. Os resultados apontaram diminuição da área dos enócitos de abelhas expostas em relação ao controle. Inoue *et al.* (2022) argumentaram que a diminuição da área superficial dos enócitos foi um indicativo que estruturas e funções celulares foram prejudicadas pelas exposições a piraclostrobina, assim como ocorreu com os enócitos de *B. atratus* expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Os pesquisadores também observaram que não houve diferenças na área de superfície dos enócitos entre os grupos expostos, o que também foi observado em enócitos de *B. atratus* expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil na atual pesquisa. Em relação as células pericárdicas, Inoue *et al.*

(2022) concluíram que as exposições a piraclostrobina causaram redução da área superficial celular em comparação ao controle. Os pesquisadores não observaram diferença da área superficial das células pericárdicas entre os grupos expostos a piraclostrobina. Os resultados da análise morfométrica das células pericárdicas de Inoue *et al.* (2022) diferiram do padrão observado na atual pesquisa. *A. mellifera* expostas a piraclostrobina apresentaram diminuição da área superficial das células, enquanto as células pericárdicas de *B. atratus* expostas ao fipronil apresentaram aumento da área em todos os grupos experimentais. As divergências entre as duas pesquisas ocorreram possivelmente devido à diferença de toxicidade entre as substâncias analisadas, além de ocorrer variação de suscetibilidade entre espécies diferentes. A exposição a concentrações maiores de piraclostrobina causou estágio IV de ativação das células pericárdicas e consequentemente o colapso das células, causando redução da área superficial, como apontado pelos pesquisadores. O mesmo não ocorreu com as exposições ao fipronil na atual pesquisa, em que foi observado estágios II e III de ativação das células pericárdicas expostas ao fipronil, o que não configura colapso celular (Abdalla; Domingues, 2015).

A pesquisa desenvolvida por Bálamo *et al.* (2020) obteve resultados similar ao de Inoue *et al.* (2022) em relação aos efeitos de agrotóxicos sobre as células do SHN de *A. mellifera*. Bálamo *et al.* (2020) realizaram análise morfométrica de enócitos e células pericárdicas das abelhas expostas a concentrações subletais de tiametoxam (0,0856 ng e 0,00856 ng por abelha) e aos esporos do parasita *N. ceranae*. Os resultados da análise morfométrica dos enócitos na pesquisa de Bálamo *et al.* (2020) convergiram com o padrão observado na atual pesquisa com *B. atratus* expostas ao fipronil. Os pesquisadores analisaram os efeitos da exposição de somente um dos contaminantes, agrotóxico ou parasita, e a exposição a ambos, agrotóxico e parasita. Os resultados demonstraram que as exposições, tanto de forma isolada como associada, causaram diminuição da área dos enócitos. Por essa razão, os pesquisadores argumentaram que funcionalidade das células foi prejudicada. A redução da área celular dos enócitos foi mais acentuada na exposição que ocorreu de forma associada, agrotóxico e parasita, causando maiores danos ao organismo de *A. mellifera*. Os pesquisadores reforçaram o argumento de que a diminuição na área de superfície das células é um parâmetro confiável para indicar a toxicidade de agrotóxicos, assim como ocorreu na atual pesquisa.

Os resultados da análise morfométrica das células pericárdicas realizada por Bálamo *et al.* (2020) foram similares aos de Inoue *et al.* (2022), mas divergiram da atual

pesquisa. As exposições ao tiametoxam e a *N. ceranae* causaram diminuição da área das células pericárdicas em *A. mellifera*. A diminuição da área ocorreu possivelmente devido a morte celular das células pericárdicas. Na atual pesquisa, as concentrações de fipronil analisadas não chegaram a causar morte celular das células pericárdicas em *B. atratus*, mas a intensificação da atividade pinocítica (estágios II e III de ativação) em todas as concentrações analisadas ($1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$). Assim, a ação do fipronil causaram aumento da área das células pericárdicas em *B. atratus*, identificado pela análise morfométrica. Os resultados da morfometria de Bálamo *et al.* (2020) foram similares aos de Inoue *et al.* (2022), possivelmente por analisarem efeitos subletais de agrotóxicos sobre a mesma espécie, *A. mellifera*. As divergências dos resultados da morfometria das células pericárdicas entre a atual pesquisa e a realizada por Bálamo *et al.* (2020) e Inoue *et al.* (2022) ocorreu possivelmente devido a diferença de toxicidade entre as substâncias analisadas, e da variação de suscetibilidade entre espécies diferentes (*B. atratus* e *A. mellifera*).

Os resultados da classificação dos níveis danos dos nucleoides das células do SHN foram obtidos por meio do ensaio cometa. O grupo controle e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram predomínio de nível de dano 0, sem danos significativos ao material genético. Os grupos expostos a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram níveis de dano 2 e 3, com predomínio de nível 2, indicando dano médio ao material genético. Os resultados dos parâmetros quantitativos tabelados (índice de dano, dano total e frequência de dano) indicaram que as exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil apresentaram maior genotoxicidade em comparação com a exposição de $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, mas não entre ambas. Os valores do índice de dano, dano total e frequência de dano observados no grupo controle são comuns mesmo em tecidos saudáveis e indicaram danos ao material genético relacionados ao processo de ciclo celular, em que as células podem apresentar danos estruturais generalizados ao longo do ciclo de vida (Suryadevara *et al.*, 2024). A média e o desvio padrão do índice de dano, dano total e frequência de dano em cada tratamento foram tabelados, demonstrando o mesmo panorama, genotoxicidade mais acentuada em $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e danos de menor intensidade para o controle e exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil.

A análise estatística do ensaio cometa foi realizada por meio dos valores do dano total. Os danos genotóxicos causados pelo efeito do fipronil sobre as células do SHN foram maiores nas concentrações de $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$. Houve diferença de danos

totais entre o grupo controle e exposto a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$, controle e exposto a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, mas não houve diferença entre o controle e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$. Entre os grupos expostos houve diferença entre $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, mas não houve diferença entre $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil. Os resultados indicaram que todas as exposições induziram a danos sobre o material genético das células do SHN. Embora a concentração de $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ não tenha causado danos genotóxicos, a análise morfológica indicou ser capaz de alterar as estruturas celulares, como o formato ramificado do núcleo dos trofócitos, mesmo de forma moderada em comparação com as demais exposições. Entre as exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil não houve diferença no teste de genotoxicidade, o que indica que ambos os tratamentos foram igualmente prejudiciais para o material genético das células do SHN.

Os resultados da análise genotóxica correlacionaram com o padrão observado pelas demais análises realizadas na pesquisa. Embora tenha causado danos para as células do SHN, a concentração de $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil apresentou efeitos toxicológicos de menor magnitude em comparação com as demais exposições. Outro importante padrão observado na atual pesquisa foi que a intensidade de danos genotóxicos causados pelas exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil foram similares para *B. atratus*. A análise do ensaio cometa concluiu que os efeitos da exposição ao fipronil são deletérios para células do SHN, principalmente a partir de $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$. Com menor toxicidade, a exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ também demonstrou efeitos deletérios sobre as células do SHN de *B. atratus* e pode ser considerada a "dose limite" de fipronil para a espécie (Borsuk *et al.*, 2021). Contudo, as concentrações de $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil podem induzir a danos sobre o material genético de maneira mais acentuada, levando a formação de núcleos picnóticos e colapso celular (Demarini, 2021).

O ensaio cometa atuou como uma eficiente ferramenta para análise de efeitos genotóxicos de agrotóxicos para espécies de abelhas em trabalho realizado por Mitkovska *et al.* (2025). Os pesquisadores utilizaram o ensaio cometa para avaliar o efeito genotóxico dos acaricidas fluvalinato, amitraz e coumafós sobre os espermatozoides de zangões em *A. mellifera*. Os danos celulares podem levar a reduções da taxa de fertilidade dos zangões. As abelhas foram coletadas de quatro apiários distintos em regiões na Bulgária, próximas a áreas agrícolas, Kranevo, Plovdiv, Vinitsa e Dimovtsi. Os resultados da pesquisa demonstraram que o material genético dos espermatozoides apresentou níveis de danos consideráveis, demonstrando genotoxicidade para as abelhas analisadas. Os

pesquisadores concluíram que os agrotóxicos podem prejudicar a qualidade do espermatozoide, resultando em redução quantitativa, prejudicando a integridade das células e a fertilidade das abelhas. Os pesquisadores afirmaram ainda a possibilidade de ocorrer efeitos cumulativos e sinérgicos dos agrotóxicos sobre as abelhas. Os resultados de Mitkovska *et al.* (2025) relacionaram com a atual pesquisa ao utilizar o ensaio cometa para analisar os efeitos genotóxicos de agrotóxicos e demonstrar com eficiência os danos sobre o material genético.

Algumas pesquisas realizaram o ensaio cometa para análise de genotoxicidade causado por agrotóxicos sobre células de diversos órgãos. Os pesquisadores concluíram que o ensaio cometa é uma ferramenta útil em pesquisas ecotoxicológicas. Gastelbondon-Pastrana *et al.* (2019) utilizaram o ensaio cometa para avaliar danos ao DNA em células intestinais e ovarianas de *Ceraeochrysa claveri*, expostas a concentrações subletais de azadiractina durante o estágio larval. A azadiractina é um biopesticida utilizado como alternativa aos agrotóxicos sintéticos de formulações comerciais de alta toxicidade. As concentrações utilizadas foram 36 mg L⁻¹ e 60 mg L⁻¹, concentração mínima e máxima recomendadas em culturas agrícolas. Os resultados indicaram que a porcentagem de insetos não viáveis foi maior na exposição a 60 mg L⁻¹, embora observados em menor porcentagem na exposição a 36 mg L⁻¹ de azadiractina. Os danos ao DNA foram observados em células intestinais e do ovário em ambas as doses de azadiractina, demonstrando a eficiência da técnica para análise de genotoxicidade.

O trabalho realizado por Villar e Ojeda (2019) foi importante por demonstrar a eficiência da aplicação do ensaio cometa para pesquisas ecotoxicológicas associadas a exposições de espécies de abelhas a agrotóxicos. Os resultados foram similares ao observado com as exposições ao fipronil em *B. atratus*, principalmente nas concentrações de 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹. Os pesquisadores analisaram o efeito genotóxico de doses subletais de cipermetrina, endosulfan e glifosato sobre as células hipofaríngeas de *A. mellifera* por meio do ensaio cometa. Assim como o fipronil, cipermetrina, endosulfan e glifosato atuam no sistema nervoso das abelhas, interrompendo processos de aprendizagem, memória, navegação e funções cognitivas (Villar; Ojeda, 2019). Os resultados demonstraram que houve diferença em relação aos danos genotóxicos das exposições ao endosulfan e glifosato em comparação ao controle. Somente a menor concentração de cipermetrina (0,016 µg mL⁻¹) não causou danos significativos para as células analisadas na pesquisa. Os pesquisadores concluíram que as doses avaliadas,

embora subletais, provocaram efeito genotóxico para as células hipofaríngeas de *A. mellifera*. Mais uma vez os resultados das exposições a doses subletais de agrotóxicos foram prejudiciais aos polinizadores e convergiram com os resultados obtidos em *B. atratus* na atual pesquisa, demonstrando a eficiência do ensaio cometa para testes de genotoxicidade relacionados com exposições a pesticidas.

O efeito subletal do fipronil afeta as capacidades cognitivas das abelhas, prejudicando diversas habilidades, incluindo a orientação espacial durante a atividade de forrageio. A atual pesquisa avaliou o efeito do fipronil sobre as células do SHN de *B. atratus*, por caracterizar-se como a primeira linha de barreira contra substâncias tóxicas no organismo dos insetos. O trabalho complementou a pesquisa de Provase *et al.* (2024), que analisaram os efeitos subletais do fipronil, as mesmas concentrações avaliadas na atual pesquisa, sobre células do sistema nervoso de *B. atratus*. Os pesquisadores analisaram o efeito genotóxico de concentrações subletais do fipronil, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, sobre as Células Kenyon, localizadas no cérebro de forrageiras de *B. atratus* por meio do ensaio cometa. Os pesquisadores realizaram a análise do índice de danos, dano total e frequência de danos. Os resultados indicaram que os danos genotóxicos foram mais acentuados na concentração de 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$. Embora com danos celulares mais brandos em relação a exposição a 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, a concentração de 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ também causou danos ao material genético nas células de Kenyon. Portanto, ambas as exposições apresentaram genotoxicidade para as células de Kenyon de *B. atratus* expostas ao fipronil. O estudo de Provase *et al.* (2024), embora tenha analisado células diferentes do SHN, demonstrou evidências sobre a toxicidade do fipronil em células neurais de abelhas por meio do ensaio cometa, o que evidencia a eficácia da técnica para análise de genotoxicidade utilizado na atual pesquisa. Os resultados de Provase *et al.* (2024) foram importantes para o atual trabalho por concluir que as mesmas doses de fipronil utilizadas causaram danos em diferentes sistemas de *B. atratus*, evidenciando a toxicidade do fipronil para a espécie, mesmo em doses subletais. O cenário é importante pois demonstra que o SHN, caracterizado como a primeira linha de barreira contra substâncias tóxicas em insetos (Abdalla; Domingues, 2015), não foi capaz de neutralizar completamente os efeitos de doses subletais de fipronil e causou danos celulares em mais órgãos de *B. atratus*. A atual pesquisa efetuou a análise da exposição a 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil sobre as células do SHN, para dimensionar a variação da concentração da substância encontrada em campo.

Futuros trabalhos para complementação dos efeitos das mesmas concentrações de fipronil poderiam ser realizadas por meio de análises de outros órgãos de *B. atratus*.

Com uma abordagem semelhante a atual pesquisa e a realizada por Provase *et al.* (2024), estudos realizados por Boeing *et al.* (2024) avaliaram a genotoxicidade do cádmio sobre as células do SHN de operárias forrageiras de *B. atratus* por meio do ensaio cometa. Os pesquisadores avaliaram os efeitos das concentrações consideradas seguras pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de 0,001 mg kg⁻¹ e 0,003 mg kg⁻¹. Os resultados indicaram que as células do SHN do grupo controle não apresentaram danos do material genético. O grupo exposto a 0,001 mg kg⁻¹ apresentou predominância de cometas nos níveis 2 e 3 (dano moderado), enquanto o grupo exposto a 0,003 mg kg⁻¹ apresentou cometas nível 4 (dano total). A análise estatística dos resultados demonstrou que não foi observado diferença entre o grupo controle e exposto a 0,001 mg kg⁻¹, nem entre os grupos experimentais, 0,001 mg kg⁻¹ e 0,003 mg kg⁻¹. Ocorreu diferença apenas entre o grupo controle e exposto a 0,003 mg kg⁻¹. Os resultados de Boeing *et al.* (2024) correlacionaram com os da atual pesquisa, visto que foi possível determinar uma dose limite de cádmio (0,001 mg kg⁻¹), assim como a de fipronil (1,5 µL L⁻¹) para *B. atratus*. A pesquisa de Boeing *et al.* (2024) também revelou que metais-traço, de forma genérica, apresentam maior toxicidade para os polinizadores, assim como apontado por Abdalla e Domingues (2015) e Nogueira *et al.* (2019), em comparação com agrotóxicos de natureza orgânica, como o fipronil.

A análise histoquímica de fluorescência para avaliar os efeitos genotóxico do fipronil foi realizada por meio da técnica AO. Resultados importantes que complementaram a análise realizadas pelo ensaio cometa e pela análise morfológica foram obtidos. A análise histoquímica de fluorescência deixou evidente os danos toxicológicos do fipronil causados principalmente pelas exposições de 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹ sobre as células do SHN. O material genético foi impactado pela ação de fipronil em todos os grupos celulares analisados. Os resultados indicaram que o efeito da ação do fipronil poderiam causar alterações nas expressões gênicas devido aos danos observados. Ao serem marcados pelo AO, os núcleos celulares de células apoptóticas com cromatina fragmentada passaram a emitir fluorescência vermelha ou laranja, como ocorreu com o núcleo das células expostas a 2,5 µL L⁻¹ e 3,5 µL L⁻¹ de fipronil. O citoplasma de células saudáveis pode emitir fluorescência vermelha ou laranja, uma vez que após o processo de transcrição do DNA, as moléculas com fita simples de RNA migram para o citoplasma,

e podem ser marcadas pelo AO (Collins, 2004; Byvaltsev *et al.*, 2019). Este último quadro pode ser observado em trofócitos e enócitos do grupo controle, indicando que essas células desempenhavam normalmente as atividades celulares e expressavam suas proteínas durante o processo de tradução. No entanto, a atual pesquisa baseou-se apenas na análise do núcleo celular e os danos causados ao material genético pelos efeitos genotóxicos do fipronil.

Os resultados da histoquímica de fluorescência demonstraram que núcleos de trofócitos, enócitos e células pericárdicas dos grupos controle e exposto a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$ emitiram fluorescência verde. O cenário indicou que não foi observado danos ao material genético nas células do SHN analisadas, como fragmentação e compactação da cromatina. Em contrapartida, as exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ apresentaram núcleos de trofócitos, enócitos e células pericárdicas com fluorescência vermelha, indicativo de danos estruturais do material genético causados pela exposição ao fipronil. Os resultados indicaram que as células com núcleos vermelhos apresentaram danos sobre a estrutura do material genético e que a expressão de proteínas poderia ser prejudicada, afetando a funcionalidade e todo o ciclo celular. O quadro é característico de apoptose celular e evidencia a genotoxicidade do fipronil em *B. atratus* nas concentrações de $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ (Syromyatnikov *et al.*, 2020). Os resultados convergiram principalmente com os observados na análise genotóxica por meio do ensaio cometa e pela análise morfológica, em que foi observado danos sobre a estrutura do núcleo das células expostas ao fipronil. Os resultados da análise morfológica não indicaram danos celulares nas células do grupo controle, enquanto nas exposições a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil foi observado núcleos atípicos em todos os grupos celulares, com danos mais acentuados nas exposições de $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$. Os resultados da análise genotóxica realizada por meio do ensaio cometa demonstraram o mesmo padrão.

A técnica de coloração AO é eficiente por evidenciar os danos ao material genético causado pela ação de agrotóxicos. O trabalho desenvolvido por Provase *et al.* (2021) analisou o efeito da exposição subletal de $110 \mu\text{L L}^{-1}$ de mercúrio sobre células do cérebro, as células de Kenyon, de operárias de *B. atratus*. Os pesquisadores realizaram análise histoquímica de fluorescência por meio do AO para avaliar possíveis danos genotóxicos do mercúrio sobre essas células. Os resultados demonstraram que as abelhas do controle apresentaram núcleos verdes, sem indícios de danos ao material genético, enquanto as abelhas expostas ao mercúrio apresentaram fluorescência vermelha, indicativo de morte

celular devido a compactação e fragmentação da cromatina. Os pesquisadores concluíram que a exposição ao mercúrio causou severos danos ao material genético das células de Kenyon, mesmo em dose subletal, com células identificadas em processo de morte celular devido à observação de núcleos picnóticos. Os pesquisadores reforçaram que a fragmentação da cromatina poderia inativar a expressão de genes essenciais para a manutenção de mecanismos celulares relacionados com a reparo do DNA, induzindo à picnose nuclear. Dessa forma, a pesquisa de Provase *et al.* (2021) concluiu que o mercúrio apresentou capacidade de alterar a configuração de bases nitrogenadas do DNA, desencadeando danos ao material genético, o que inevitavelmente prejudicaria o controle das atividades metabólicas e funções celulares das células do sistema nervoso de *B. atratus*. Portanto, os danos causados sobre as células de Kenyon poderiam desestabilizar a capacidade sensorial e orientação espacial das abelhas, prejudicando a atividade de forrageio e todo ciclo de vida das abelhas neotropicais de *B. atratus*. Embora a pesquisa de Provase *et al.* (2021) foi realizada com células do sistema nervoso e com metal-traço, diferentemente da atual pesquisa, fica claro os resultados da ação genotóxica de agrotóxicos analisados por meio do AO em *B. atratus*. A pesquisa de Provase *et al.* (2021) demonstrou que a exposição ao mercúrio não foi neutralizada pelas células do SHN e que as células de outros órgãos, como no cérebro, foram prejudicadas indicando efeitos genotóxicos do agrotóxico em dose subletal. Desta forma, o SHN caracterizado como primeira barreira para neutralização de compostos químicos presentes no organismo dos insetos (Abdalla; Domingues, 2015), novamente não foi suficiente para neutralizar a ação de agrotóxicos no organismo de *B. atratus*, principalmente as substâncias com alta toxicidade, como metais-traço (Nogueira *et al.*, 2019).

A atual pesquisa demonstrou que as exposições de 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil causaram danos celulares mais intensos em *B. atratus*. A cromatina apresentou fragmentação e foi marcada em vermelho pelo AO como indicativo de genotoxicidade, o que poderia desencadear os efeitos subletais e comprometer a aptidão das abelhas. Nogueira *et al.* (2019) obtiveram resultados similares ao analisarem as células do SHN de *B. morio* e *B. atratus* de indivíduos expostos a concentração subletal de mercúrio. Os pesquisadores realizaram análise histoquímica de fluorescência por meio do AO. Os resultados indicaram que os núcleos dos enócitos, trofócitos e células pericárdicas do grupo de controle de ambas as espécies emitiram fluorescência verde, sem indícios de danos genotóxicos. Após a exposição ao mercúrio, os núcleos das células do SHN

emitiram fluorescência vermelha, indicando danos aos cromossomos causados pela fragmentação da cromatina (Syromyatnikov *et al.*, 2020), assim como na atual pesquisa. Os resultados indicaram que os danos genotóxicos causados pela exposição ao mercúrio podem levar a morte das células do SHN de operárias de *B. atratus* e *B. morio*. Os pesquisadores concluíram que a exposição ao mercúrio poderia prejudicar a aptidão dos indivíduos de *B. morio* e *B. atratus*, com potencial para representar uma ameaça para as espécies de abelhas neotropicais (Nogueira *et al.*, 2019). Os pesquisadores demonstraram o potencial para impactar populações de abelhas do gênero *Bombus* que o mercúrio pode representar no ambiente. A atual pesquisa direciona para a mesma perspectiva o cenário observado sobre os efeitos subletais das concentrações de fipronil analisadas em *B. atratus*.

A homeostase metabólica é controlada por órgãos associados ao metabolismo no organismo dos insetos (He *et al.*, 2020). Carboidratos, proteínas e lipídios são moléculas encontradas principalmente nas células do corpo gorduroso como fontes de reservas energéticas. A ação do fipronil sobre as células do SHN pode prejudicar o armazenamento e mobilização de moléculas, de forma que a alteração do conteúdo energético nas células é indício dos efeitos subletais do fipronil e outras substâncias tóxicas (He *et al.*, 2020; Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). A ação do fipronil pode ainda afetar a funcionalidade de órgãos como o intestino, prejudicando a absorção e distribuição de nutrientes para o organismo da abelha (Farder-Gomes *et al.*, 2021). A ação de substâncias tóxicas pode também causar inflamações, levando a respostas imunológicas que demandam energia e levam a mobilização de moléculas estocadas no corpo gorduroso (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). Desta forma, pode ocorrer diminuição do conteúdo de moléculas como proteínas, carboidratos e lipídios nas células do SHN, principalmente nos trofócitos, que armazenam substâncias em seu citoplasma (He *et al.*, 2020; Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021).

Por outro lado, o estresse oxidativo causado pela ação do fipronil nas células pode prejudicar processos relacionados com as vias glicolíticas e lipolíticas, levando ao aumento de conteúdos energéticos em determinados casos. No entanto, as pesquisas não esclarecem as causas do aumento de conteúdos energéticos nas células do corpo gorduroso em insetos e o processo permanece desconhecido. Pesquisas realizadas com mamíferos apontaram que a exposição ao fipronil em ratos interrompeu processos relacionados com a fosforilação oxidativa, prejudicando a produção de ATP nas

mitocôndrias (Souders II *et al.*, 2021). Portanto, a exposição a agrotóxicos poderia aumentar ou diminuir os recursos energéticos em células que armazenam essas moléculas (He *et al.*, 2020; Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021; Souders II *et al.*, 2021). A observação da alteração de conteúdos de glicogênio, triglicerídeos e proteínas nas células do SHN dos indivíduos expostos pode indicar os efeitos subletais do fipronil em *B. atratus*. Assim, a pesquisa realizou a análise histoquímica das células do SHN para observar o conteúdo de glicogênio, por meio da técnica de coloração PAS, proteínas, por meio do Azul de Bromofenol e triglicerídeos, por meio do Sudan Black.

As abelhas consomem grandes quantidades de açúcar para fornecer energia para atividades de forrageio (Chapman, 2013). Para absorção de carboidratos complexos, primeiro as abelhas quebram dissacarídeos em monossacarídeos, únicos carboidratos absorvidos pelo epitélio do intestino médio (Crailsheim, 1988). O processo depende da atuação de enzimas que convertem sacarose em glicose e frutose, encontradas dessa forma na hemolinfa (Crailsheim, 1988; Chapman, 2013). Assim, o metabolismo das células do SHN é mediado em comunicação com a hemolinfa (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). Os trofócitos são capazes de absorver e liberar conteúdos energéticos presentes na hemolinfa, de forma que moléculas são armazenadas em vacúolos citoplasmáticos (Kovalskyi; Zhmur, 2024). Os trofócitos do grupo controle foram marcados pelos PAS, indicando presença de glicogênio no citoplasma. O mesmo ocorreu com os trofócitos dos grupos expostos ao fipronil em todas as concentrações analisadas ($1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$), indicando que a metabolização de conteúdos energéticos foi prejudicada. Os resultados indicaram que as exposições ao fipronil não prejudicou a capacidade dos trofócitos em armazenar carboidratos. Durante a via glicogênica, a glicose é convertida em glicogênio e acumulada nos trofócitos (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). Os resultados podem estar associados a alimentação a base de sacarose realizada durante os bioensaios, que poderia explicar a presença de polissacarídeos nas células do SHN das abelhas. Os resultados também podem estar associados ao colapso dos trofócitos dos grupos expostos observado por meio da análise morfológica, principalmente nas exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, o que possivelmente prejudicou a metabolização de moléculas presentes no citoplasma dessas células. O material genético também foi prejudicado de forma mais severa em abelhas expostas a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil, possivelmente inviabilizando processos relacionados com a expressão de enzimas e proteínas transportadoras relacionadas com a metabolização da glicose no meio

intracelular. Caso os efeitos das exposições levassem a formação de espécies reativas de oxigênio nas células, existe a possibilidade de ocorrer danos sobre organelas como as mitocôndrias e prejudicar a metabolização de carboidratos nas células do SHN de *B. atratus* (He *et al.*, 2020; Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021; Souders II *et al.*, 2021). É válido reforçar que tais causas são suposições, e que a comprovação dos fatos necessita de mais análises.

Os enócitos do grupo controle e expostos ao fipronil foram marcados pelo PAS, como observado nos trofócitos, indicando presença de conteúdo citoplasmático de carboidratos. Os enócitos estão relacionados com a síntese de carboidratos disponibilizados na hemolinfa (Lu *et al.*, 2021). Portanto, era esperado a presença de carboidratos no citoplasma dos enócitos no grupo controle. Os motivos da presença de conteúdo de glicogênio nos enócitos dos grupos expostos ao fipronil podem ser atribuídos as mesmas causas do panorama observado nos trofócitos. As exposições podem ter contribuído para formação de espécies reativas de oxigênio nos enócitos, causando danos sobre estruturas celulares e prejudicando a metabolização e mobilização de carboidratos (He *et al.*, 2020; Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). O material genético dos enócitos também foi prejudicado nas exposições de $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil, como foi demonstrado pela análise genotóxica e histoquímica de fluorescência, o que poderia inviabilizar os processos relacionados com a expressão de enzimas relacionadas com a metabolização da glicose. Assim como nos trofócitos, essas explicações sobre a observação de glicogênio nos enócitos das abelhas expostas a agrotóxicos são especulações, pois os trabalhos não esclarecem as causas concretas e os motivos permanecem desconhecidos.

As células pericárdicas filtram e neutralizam substâncias da hemolinfa, retornando os metabólitos em condições a serem excretados novamente pelos túbulos de Malpighi (Zavodska; Sehadova, 2023). Devido a rápida metabolização, as células podem mobilizar rapidamente os conteúdos de glicose para atender suas necessidades energéticas (Vardanis, 1963). As células pericárdicas do grupo controle e expostos foram marcadas pelo PAS, indicando a presença de polissacarídeos no citoplasma. A presença de carboidratos e outras moléculas energéticas é indício da atividade pinocítica realizado pelas células pericárdicas. Dessa forma, pode-se afirmar que a hemolinfa das abelhas dos grupos expostos ao fipronil apresentavam carboidratos, o que pode estar associados com a alimentação rica em sacarose durante os bioensaios.

Em associação com a atual pesquisa, diversos estudos relataram a presença de grânulos de glicogênio no citoplasma dos trofócitos de diversas espécies de abelhas. Carneiro *et al.* (2023) efetuou análise histoquímica de células do intestino médio e corpo gorduroso de larvas de *A. mellifera* expostas a concentração subletal encontrada em campo de imidacloprida. Os pesquisadores demonstraram que a análise do conteúdo de carboidratos por meio do PAS indicou presença de grânulos de glicogênio nos trofócitos dos grupos controle e exposto. Os pesquisadores concluíram que a exposição a imidacloprida não influenciou a mobilização da reserva de carboidratos. De maneira similar, pesquisa realizada por Tadei *et al.* (2024) sobre os efeitos das exposições subletais de acetamiprida e azoxistrobina em *C. analis* avaliou o conteúdo de glicogênio das células do SHN e intestino médio por meio do PAS. Os pesquisadores demonstraram que existiu variação da resposta metabólica de machos e fêmeas frente à exposição aos agrotóxicos. Em associação com a atual pesquisa, os resultados foram similares em muitos aspectos. Não foi observado diferença em relação ao conteúdo de glicogênio dos trofócitos em fêmeas expostas aos agrotóxicos em relação ao controle. Porém, as exposições a acetamiprida promoveram aumento do conteúdo de carboidratos no citoplasma dos trofócitos dos machos, que eram mais sensíveis a toxicidade de agrotóxicos. O mesmo foi observado em trofócitos de pesquisas relacionadas com *Drosophila melanogaster* após um curto período exposição a agrotóxicos (Karpova *et al.*, 2019). Os resultados da análise do conteúdo de glicogênio também são similares em pesquisa realizada por Assis *et al.* (2022), que destacaram a presença de depósitos de glicogênio no citoplasma dos trofócitos dos grupos expostos a piraclostrobina e a associação de piraclostrobina e imidacloprida.

Os processos envolvidos com o acúmulo de carboidratos em trofócitos de indivíduos expostos a agrotóxicos permanecem desconhecidos. Segundo Tadei *et al.* (2024), o acúmulo de glicogênio em machos de *C. analis* expostos a acetamiprida poderia estar associado com a alimentação rica em sacarose realizada nos bioensaios, também efetuada na atual pesquisa, associado a um possível efeito neurotóxico dos agrotóxicos sobre a corpora cardíaca no cérebro dos insetos. Essas estruturas são responsáveis pela produção e armazenamento de neuro-hormônios, como os hormônios adipocinéticos (AKHs) (Tadei *et al.*, 2024). Estes, por sua vez, atuam na manutenção e regulação de conteúdos energéticos mediante a demanda metabólica no organismo desses animais, ou seja, pela conversão de glicogênio em glicose (Bednárová *et al.*, 2013; Tadei *et al.*, 2024).

Durante situações de alta demanda metabólica, os AKHs são liberados para mobilização do conteúdo de carboidratos armazenados nos grânulos citoplasmáticos dos trofócitos (Nelson; Saunders; Johnson, 2021). Caso o mecanismo seja afetado pela ação dos agrotóxicos, conteúdos de carboidratos não poderiam ser mobilizados pelos trofócitos, o que explicaria os resultados observados em diversas pesquisas, incluindo a atual. No entanto, para aferir determinada causa, são necessários futuros trabalhos para elucidar as relações entre corpora cardíaca com os conteúdos de glicose observados em trofócitos de insetos expostos a agrotóxicos.

O trabalho realizado por Bálsamo *et al.* (2020) sobre o efeito do tiametoxam (0,0856 ng e 0,00856 ng por abelha) e parasita *N. ceranae* sobre as células do SHN de *A. mellifera* também verificou o conteúdo de carboidratos nas células por meio do PAS. Os resultados indicaram que ocorreu presença de carboidratos no citoplasma dos trofócitos dos grupos expostos. Os trofócitos apresentaram maior incidência dos grânulos de glicogênio, tanto nas exposições ao tiametoxam como ao parasita. Nos enócitos foi observado uma quantidade basal de grânulos de glicogênio, enquanto as células pericárdicas apresentaram pequeno aumento do conteúdo de glicogênio nos grupos expostos. Em suma, os resultados de Bálsamo *et al.* (2020) demonstraram inatividade dos trofócitos, impedindo a mobilização do conteúdo de carboidratos marcados pelo PAS nas abelhas dos grupos expostos. Os pesquisadores ressaltaram que os trofócitos dos grupos expostos ao agrotóxico e ao parasita apresentaram alterações morfológicas, as mesmas observadas na atual pesquisa, o que poderia inviabilizar enzimas e proteínas transportadoras no citoplasma das células, prejudicando mecanismos celulares relacionados ao controle da mobilização de moléculas do citoplasma para a hemolinfa (Bálsamo *et al.*, 2020). É importante enfatizar que a atual pesquisa não realizou análises bioquímicas para avaliar a atividade de enzimas ou da taxa de glicólise, de forma que os levantamentos não podem ser utilizados para explicar a presença de grânulos de glicogênio no citoplasma dos trofócitos dos grupos expostos ao fipronil. Os levantamentos são realizados para discussões sobre possíveis causas para o cenário observado na atual pesquisa e que poderia ser averiguado em futuras pesquisas.

As proteínas desempenham funções essenciais para organismos biológicos como componentes de estruturas celulares e para a síntese de enzimas, hormônios, neurotransmissores, entre outros grupos moleculares fundamentais para manutenção das atividades metabólicas do organismo (Liu *et al.*, 2020). As proteínas também podem ser

utilizadas como fonte de energia como substrato via gliconeogênese para produzir glicose (Haunerland; Shirk, 1995). As reservas proteicas são intensamente utilizadas durante a metamorfose e contribuem para sobrevivência dos insetos em períodos de escassez de fontes alimentares (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021). Nos insetos, a neutralização de substâncias tóxicas está associada com a atividade de determinados complexos enzimáticos, como o citocromo P450, glutathiona-S-transferase (GST) e pela UDP-glicuronil transferase (Li; Schuler; Berenbaum, 2007; Ahn; Vogel; Heckel, 2012). A resistência à substâncias tóxicas é determinada pela expressão de genes relacionados com a tradução de proteínas que neutralizarão essas substâncias (Grosso *et al.*, 2016).

A técnica de coloração Azul de Bromofenol foi utilizada para análise do conteúdo proteico no citoplasma das células do SHN. Os trofócitos apresentaram nítida diminuição dos grânulos de proteínas nos grupos expostos ao fipronil, enquanto o controle foi bastante marcado pela técnica. A presença de proteínas tornou-se mais escassa à medida que as concentrações de fipronil aumentaram. Os trofócitos expostos a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil foram pouco marcados pelo Azul de Bromofenol, seguido pelas exposições a $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$. Os resultados indicaram uma possível mobilização de proteínas estocadas no citoplasma dos trofócitos para atender as necessidades energéticas no organismo das abelhas expostas ao fipronil. Quanto maior a dose de fipronil administrada, maior a necessidade por mobilização do conteúdo proteico no citoplasma dos trofócitos. Resultados similares foram observados na pesquisa realizada por Assis *et al.* (2022). Os pesquisadores realizaram análise histoquímica do conteúdo de proteínas em trofócitos de abelhas da espécie *T. diversipes* expostas a concentrações subletais de imidacloprida e piraclostrobina. A pesquisa utilizou a técnica de coloração Ponceau de Xilidina para marcar as proteínas. Os trofócitos das fêmeas de *T. diversipes* expostas aos agrotóxicos não apresentaram grânulos de proteínas, resultados similares aos da atual pesquisa com a exposição a $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil de *B. atratus*.

Enquanto os trofócitos armazenam moléculas, os enócitos sintetizam enzimas de desintoxicação (Huang *et al.*, 2019). A exposição a agrotóxicos aumenta os níveis de mRNA nos enócitos pela transcrição de genes que codificam enzimas, incluindo o complexo enzimático citocromo P450 (Berenbaum; Johnson, 2015). Os enócitos do grupo controle e expostos foram marcados pelo Azul de Bromofenol, indicando presença de proteínas no citoplasma. Os resultados indicaram que essas células estavam em intensa atividade nos grupos expostos ao fipronil e provavelmente expressando enzimas

relacionadas com a neutralização de substâncias tóxicas. É plausível atribuir a presença de proteínas no citoplasma dos enócitos dos grupos expostos ao fipronil pela mobilização do conteúdo proteico dos trofócitos. Entretanto, não é possível relacionar os dois cenários de forma direta, pois são necessárias análises bioquímicas em futuras pesquisas para aferir tal causa.

As crescentes exposições ao fipronil causaram diminuição do conteúdo de proteínas nas células pericárdicas, enquanto o controle foi bastante marcado pela técnica, assim como observado nos trofócitos. Os resultados indicaram mobilização de proteínas para outras células do organismo das abelhas, como os enócitos, de forma que o conteúdo proteico encontrado na hemolinfa de abelhas expostas diminuiu. O conteúdo proteico na hemolinfa das abelhas foi possível de ser identificado pela atividade pinocítica das células pericárdicas (Abdalla; Domingues, 2015; Kaabeche *et al.*, 2024).

A digestão é um processo gradual em que as moléculas dos alimentos são hidrolisadas em componentes capazes de serem absorvidos. O intestino médio nos insetos é a região associada com a digestão e absorção de substâncias, formado principalmente por enterócitos (Harwood; Amdam, 2021). A pesquisa realizada por Carneiro *et al.* (2023) sobre os efeitos da exposição subletal de imidacloprida em larvas de *A. mellifera* demonstrou alterações morfológicas dos enterócitos do intestino médio das larvas. Os pesquisadores observaram liberação de fragmentos celulares no lúmen do intestino, condensação da cromatina e apoptose dos enterócitos. Em relação ao conteúdo proteico no citoplasma dos trofócitos analisados por Carneiro *et al.* (2023), os resultados indicaram diminuição do conteúdo proteico das células expostas ao agrotóxico em relação ao controle, assim como observado em *B. atratus* expostas ao fipronil. A absorção e disponibilização de nutrientes para as células do organismo das abelhas foram prejudicadas, incluindo as células do corpo gorduroso (Carneiro *et al.*, 2023). Embora a atual pesquisa não tenha analisado as células do intestino médio de *B. atratus*, é provável que tenha ocorrido danos celulares em outros órgãos (Provase *et al.*, 2024). Por outro lado, caso a capacidade de absorção do intestino fosse prejudicada, o conteúdo de glicogênio e triglicerídeos nos trofócitos de *B. atratus* também diminuiria nos grupos expostos ao fipronil, o que não ocorreu. A relação entre a exposição ao fipronil, a diminuição do conteúdo de proteínas e aumento de glicogênio e triglicerídeos nas células pode ser causado por danos sobre estruturas celulares de *B. atratus* (Bálsamo *et al.*, 2020).

No entanto, as análises realizadas não possibilitam estabelecer as causas concretas dessas observações, sendo necessárias mais análises em futuras pesquisas.

A pesquisa realizada por Reis *et al.* (2024) analisou o conteúdo de proteínas nos trofócitos de *A. mellifera* expostas a doses subletais de ciflumetofem. Os pesquisadores observaram mobilização de conteúdos proteicos em abelhas expostas ao agrotóxico em comparação ao controle, similar ao observado em *B. atratus* expostas ao fipronil. Os resultados foram atribuídos a mobilização das proteínas envolvidas no processo de desintoxicação de substâncias tóxicas no organismo das abelhas, como glicosiltransferases, citocromos P450, carboxilases, esterases e glutathione-S-transferases. A mobilização de proteínas nos trofócitos das abelhas expostas aos agrotóxicos poderia comprometer a síntese de outras moléculas essenciais para o metabolismo dos insetos, como lipoforinas e vitelogenina (Keeley, 1985; Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021; Reis *et al.*, 2024). As mesmas consequências poderiam ocorrer em *B. atratus* expostas ao fipronil na atual pesquisa.

O conteúdo lipídico é armazenado, processado e liberado para hemolinfa no organismo dos insetos por meio das células do corpo gorduroso. Os lipídios são encontrados nas células na forma de triglicerídeos e utilizados para síntese de compostos e obtenção de energia. As principais vias de transformação dos lipídios nas células são a lipogênese e a lipólise. Na lipogênese, os lipídios obtidos via alimentação são absorvidos por meio do intestino médio, transferidos para a hemolinfa, hidrolisados em ácidos graxos e transportados para o corpo gorduroso. Os ácidos graxos e glicerol formam os triglicerídeos encontrados nas células. A lipólise é a hidrólise de triglicerídeos, de forma que os ácidos graxos são metabolizados para obtenção de energia (Skowronek; Wójcik; Strachecka, 2021).

A análise histoquímica do conteúdo de triglicerídeos das células do SHN foi realizada por meio da técnica de coloração Sudan Black. Os trofócitos do grupo controle e dos grupos expostos em todas as concentrações de fipronil analisadas, 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$, indicaram presença de triglicerídeos no citoplasma. Os resultados indicaram que os trofócitos mantiveram a capacidade de armazenamento de triglicerídeos. Os mesmos resultados foram observados em pesquisa realizada por Assis *et al.* (2022) por meio da análise o conteúdo lipídico encontrado nos trofócitos de *T. diversipes* expostos a doses subletais de imidacloprida e piraclostrobina. Os enócitos do grupo controle e expostos ao fipronil foram marcados pelo Sudan Black, indicando

conteúdo citoplasmático de lipídios, assim como nos trofócitos. Os resultados não indicaram declínio do conteúdo de triglicerídeos no citoplasma dos enócitos dos grupos expostos ao fipronil, possivelmente devido a disponibilização realizada pelos trofócitos. A presença de lipídios nos enócitos está relacionado com a síntese de compostos que constituem a epicutícula do exoesqueleto dos insetos (Chapman *et al.*, 2013; Assis *et al.*, 2022) e de hormônios ecdisteroides, que regulam diferentes genes no cérebro e ovário das abelhas (Romer; Emmerich; Nowock, 1974; Assis *et al.*, 2022). As células pericárdicas do grupo controle e grupos expostos ao fipronil apresentaram conteúdo citoplasmático de triglicerídeos, indicando que essas moléculas estavam presentes na hemolinfa das abelhas. A atividade pinocítica da hemolinfa realizada pelas células pericárdicas foi responsável pelo conteúdo de triglicerídeos presentes no meio intracelular e reflete a disponibilização de conteúdos energéticos na hemolinfa a partir dos trofócitos.

Os resultados da análise dos conteúdos de triglicerídeos foram similares aos da análise de glicogênio nas células do HNS de *B. atratus*. Os efeitos toxicológicos do fipronil possivelmente prejudicaram os mecanismos celulares envolvidos com a mobilização de substâncias armazenadas pelos trofócitos (Bálsamo *et al.*, 2020), como glicogênio e triglicerídeos. É importante ressaltar que a análise morfológica demonstrou que as estruturas celulares e a cromatina das células das abelhas expostas ao fipronil foram prejudicadas. Dessa forma, a metabolização dos conteúdos energéticos das células, principalmente encontrados em trofócitos, poderia ser prejudicada, explicando a presença de triglicerídeos e glicogênio nas células dos indivíduos exposto ao fipronil. O controle e metabolização dos conteúdos energéticos é mediado pela associação do corpo gorduroso com outros órgãos. Caso a ação do fipronil prejudique outros órgãos relacionados com a metabolização de conteúdos energéticos, a mobilização de moléculas encontradas no citoplasma dos trofócitos poderia ser prejudicada, como o mecanismo das AKHs (Tadei *et al.*, 2024) e o intestino médio (Carneiro *et al.*, 2023). O estresse oxidativo causado pelos efeitos do fipronil poderia causar danos sobre as estruturas celulares e prejudicar a funcionalidade de organelas e processos celulares, como a mobilização de conteúdos energéticos (Gaschler; Stockwell, 2017). No entanto, não é possível determinar causalidade dos fatos, o que poderia ser efetuado em futuros trabalhos.

A atual pesquisa avaliou a presença de grânulos lipídicos no citoplasma dos trofócitos de *B. atratus* expostas ao fipronil, mas não a alteração do tamanho ou disposição espacial dos grânulos no interior das células. A pesquisa realizada por Carneiro

et al. (2023) analisou o conteúdo lipídicos das células do corpo gorduroso de *A. mellifera* expostas a imidacloprida. Os pesquisadores observaram alteração do tamanho e da disposição espacial dos grânulos de triglicerídeos nos trofócitos das larvas expostas. No grupo controle, os grânulos de triglicerídeos localizavam-se na periferia do citoplasma, enquanto no grupo exposto eram dispostos de forma homogênea. As larvas do grupo exposto também apresentaram uma concentração maior de grânulos com diâmetros menores de triglicerídeos em relação ao controle. A imidacloprida, assim como fipronil, induz o estresse oxidativo nas células, o que pode resultar em oxidação de fosfolipídios de membrana e vacúolos celulares. O processo pode afetar a organização das estruturas celulares, assim como processos metabólicos no interior das células (Gaschler; Stockwell, 2017). Portanto, a variação do tamanho e disposição dos grânulos lipídicos nos trofócitos de *A. mellifera* expostas a imidacloprida pode estar associado com estresse oxidativo causado pelo agrotóxico. Carneiro *et al.* (2023) levantaram a possibilidade de que a mobilização de lipídios no corpo gorduroso de larvas expostas também esteja relacionada com a conversão de energia para mecanismos de desintoxicação, resultando em grânulos lipídicos menores dentro das células.

A atual pesquisa ressalta a necessidade de mais estudos relacionados com os efeitos subletais de agrotóxicos sobre o organismo das abelhas nativas neotropicais, uma vez que estudos relacionados com espécies de abelhas gênero *Bombus* são limitados (Cameron; Sadd, 2020; Abrol; Mondal; Shankar, 2021). Os resultados da pesquisa foram inéditos e contribuem com os esforços para a conscientização da importância e conservação desses animais. Os resultados forneceram dados importantes sobre os efeitos toxicológicos do fipronil sobre células do SHN de *B. atratus*, com o objetivo da racionalização da utilização de substâncias químicas em sistemas agrícolas, sempre com a preocupação dos efeitos toxicológicos sobre a biodiversidade, minimizando os impactos ambientais sobre os biomas.

3.6. CONCLUSÃO

As concentrações subletais de fipronil encontradas em campo e analisadas na pesquisa foram capazes de causar danos estruturais e metabólicos para as células do SHN de *B. atratus*. Os resultados foram inéditos e demonstraram que as exposições a 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ de fipronil causaram danos de intensidade similar e mais acentuados sobre

as células em comparação com a exposição a $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, que causou danos de menor intensidade. A pesquisa concluiu que as concentrações subletais de fipronil encontradas em campo prejudicam o organismo das abelhas forrageiras de *B. atratus*.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-nephrotoxic system: A novel model of biomarkers for analysis of the ecology of stress in environmental biomonitoring. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132349, 2015.
- AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical chemistry**, v. 238, p. 1-7, 2018.
- AHN, S.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 2, p. 133-147, 2012.
- ALIYEVA, S. B.; AZIZKHANLI, S. A. Acridine Orange and Its Removal from Aqueous Solutions by Adsorption. **Separation & Purification Reviews**, p. 1-32, 2024.
- ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R.O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, n. 1, p. 57-67, 2004.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual review of entomology**, v. 55, n. 1, p. 207-225, 2010.
- ASSIS, J. C. *et al.* Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). **Environmental Pollution**, v. 304, p. 119140, 2022.
- BÁLSAMO, P. J. *et al.* Impact of sublethal doses of thiamethoxam and *Nosema ceranae* inoculation on the hepato-nephrotoxic system in young Africanized *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 350-361, 2020.
- BEDNÁŘOVÁ, A.; KODRÍK, D.; KRISHNAN, N. Unique roles of glucagon and glucagon-like peptides: Parallels in understanding the functions of adipokinetic hormones in stress responses in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 1, p. 91-100, 2013.
- BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current opinion in insect science**, v. 10, p. 51-58, 2015.
- BOEING, G.A.N.S. *et al.* Genotoxic effect of two environmentally safe doses of cadmium on the hepato-nephrotoxic system of *Bombus atratus* forager workers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 108, p. 104450, 2024.
- BORSUK, G. *et al.* Capacity of honeybees to remove heavy metals from nectar and excrete the contaminants from their bodies. **Apidologie**, p. 1-14, 2021.
- BREJCHA, M. *et al.* Seasonal changes in ultrastructure and gene expression in the fat body of worker honey bees. **Journal of insect physiology**, v. 146, p. 104504, 2023.

BUMBLEBEE, ACUTE ORAL TOXICITY TEST. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. 2017.

BYVALTSEV, V. A. *et al.* Acridine orange: a review of novel applications for surgical cancer imaging and therapy. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 925, 2019.

CAMERON, S. A. *et al.* Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 662-667, 2011.

CARNEIRO, L. S. *et al.* Effects of the insecticide imidacloprid on the post-embryonic development of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 905, p. 167278, 2023.

CESCHI-BERTOLI, L. *et al.* Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury. **Chemosphere**, v. 261, p. 127752, 2020.

CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E., 2013. The Insects Structure and Function, fifth ed. Cambridge University Press, Cambridge.

CHOHAN, K. R.; GRIFFIN, J. T.; CARRELL, D. T. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. **Andrologia**, v. 36, n. 5, p. 321-326, 2004.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**. Elsevier BV [s.l.], v. 1840, n. 2, p.794-800, fev. 2014.

COLLINS, A. *et al.* Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nature protocols**, v. 18, n. 3, p. 929-989, 2023.

COSTA, S.; TEIXEIRA, J. P. Comet assay. In: **Encyclopedia of Toxicology: Third Edition**. Elsevier, 2014. p. 1020-1023.

CRAILSHEIM, K. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Journal of insect physiology**, v. 34, n. 9, p. 839-845, 1988.

CROWTHER, L. P. *et al.* Spatial ecology of a range-expanding bumble bee pollinator. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 3, p. 986-997, 2019.

DARZYNKIEWICZ, Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. In: **Methods in cell biology**. Academic Press, 1990. p. 285-298.

DEMARINI, David M. The role of genotoxicity in carcinogenesis. 2021.

DI FIORE, C. *et al.* Honeybees as bioindicators of heavy metal pollution in urban and rural areas in the South of Italy. **Atmosphere**, v. 13, n. 4, p. 624, 2022.

DIMAURO, I. *et al.* A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. **BMC research notes**, v. 5, p. 1-5, 2012.

- DOMINGUES, C. E. C. *et al.* Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.
- FADHILAH, A.; GABBAR, A.; BOKHARI, A. A. Microsporidium. **StatPearls**, 2023.
- FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 774, p. 145679, 2021.
- FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Fipronil exposure compromises respiration and damages the Malpighian tubules of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 58, p. 88101-88108, 2022.
- FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Exposure to sublethal concentrations of imidacloprid, pyraclostrobin, and glyphosate harm the behavior and fat body cells of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Science of The Total Environment**, v. 907, p. 168072, 2024.
- FIJEN, T. P. M. *et al.* Insect pollination is at least as important for marketable crop yield as plant quality in a seed crop. **Ecology letters**, v. 21, n. 11, p. 1704-1713, 2018.
- GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.
- GASTELBONDO-PASTRANA, B. I. *et al.* The comet assay in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae): A suitable approach for detecting somatic and germ cell genotoxicity induced by agrochemicals. **Chemosphere**, v. 235, p. 70-75, 2019.
- GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, JCDR Research and Publications [s.l.], p.1-5, 2015
- GREGORC, A. *et al.* Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. **Chemosphere**, v. 147, p. 328-336, 2016.
- GROSSO, C. G. *et al.* Identification of three cytochrome P450 genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: Expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 459-470, 2016.
- HAUNERLAND, N. H.; SHIRK, P. D. Regional and functional differentiation in the insect fat body. **Annual Review of Entomology**, v. 40, n. 1, p. 121-145, 1995.
- HARWOOD, G.; AMDAM, G. Vitellogenin in the honey bee midgut. **Apidologie**, v. 52, n. 4, p. 837-847, 2021.
- HE, B. *et al.* Pesticides-induced energy metabolic disorders. **Science of The Total Environment**, v. 729, p. 139033, 2020.
- HEIER, C.; KÜHNLEIN, R. P. Triacylglycerol metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 210, n. 4, p. 1163-1184, 2018.
- HUANG, K. *et al.* RiboTag translational profiling of *Drosophila* oenocytes under aging and induced oxidative stress. **BMC genomics**, v. 20, p. 1-19, 2019.

- INOUE, L. V. B. *et al.* Harmful effects of pyraclostrobin on the fat body and pericardial cells of foragers of africanized honey bee. **Toxics**, v. 10, n. 9, p. 530, 2022.
- KARPOVA, E. K. *et al.* Stress-related hormones affect carbohydrate metabolism in *Drosophila* females. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 1, p. e21540, 2019.
- KUSUZAKI, K. *et al.* Intraoperative Photodynamic Surgery (iPDS) with acridine orange for musculoskeletal sarcomas. **Cureus**, v. 6, n. 9, 2014.
- LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, n. 1, p. 231-253, 2007.
- LISON, L. Sur de nouveaux colorants histologiques spécifiques des lipides. **Compt Rend Soc Biol**, v. 115, p. 202-205, 1934.
- LIU, H. *et al.* Dietary insect powder protein sources improve protein utilization by regulation on intestinal amino acid-chemosensing system. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1590, 2020.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 89, n. 4, p. 595-645, 1988.
- KAYA, M. Y.; GÜLTEKIN, Y. S.; GÜLTEKIN, P. Evaluation of Honey Bees within the Scope of Sustainable Development Goals and Ecosystem Services. **Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, v. 11, n. 5, p. 2397-2408. 2023
- KEELEY, L. L. Physiology and biochemistry of the fat body. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 3, p. 211-248, 1985.
- KOVALSKYI, Y.; ZHMUR, V. Features of fat body development in the body of honey bees. **Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural sciences**, v. 26, n. 100, p. 179-183, 2024.
- KOSTJUKOVA, L. O.; LEONTIEVA, S. V.; KOSTJUKOV, V. V. The vibronic absorption spectra and electronic states of acridine orange in aqueous solution. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 249, p. 119302, 2021.
- KULYK, O. G. *et al.* Novel dimeric dyes based on the acridine orange chromophore: Synthesis, characterization and application in real-time PCR. **Dyes and Pigments**, v. 200, p. 110148, 2022.
- MACINNIS, G.; FORREST, J. R. K. Field design can affect cross-pollination and crop yield in strawberry (*Fragaria x ananassa* D.). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 289, p. 106738, 2020.
- MCMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, v. 158, n. 4006, p. 202-202, 1946.
- MITKOVSKA, V. *et al.* Sperm comet assay as a novel tool in assessing genotoxicity in high-mortality honey bee (*Apis mellifera*) populations. **Apidologie**, v. 56, n. 1, p. 1-12, 2025.

- MØLLER, P. *et al.* Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817-3826, 2020.
- NELSON, J. M.; SAUNDERS, C. J.; JOHNSON, E. C. The intrinsic nutrient sensing adipokinetic hormone producing cells function in modulation of metabolism, activity, and stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7515, 2021.
- NOGUEIRA, F. L. A. *et al.* Exposure to mercury at trace concentrations leads to collapse of the hepato-nephrotoxic system in two neotropical species of bumblebee. **Am. J. Agric. Biol. Sci.**, v. 14, p. 1-10, 2019.
- OECD, 2017a. Guidelines for the Testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Bumblebee. Acute Contact Toxic. Test. N. 246.
- OECD, 2017b. Bumblebee, Acute Oral Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Test No. 247. OECD Publishing, Paris.
- OLIVEIRA, V. T. P.; CRUZ-LANDIM, C. Morphology and function of insect fat body cells: a review. **Biociências (On-line)**, v. 11, n. 2, 2003.
- ÖSTLING, O., JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 123:291-8, 1984
- PINTO, L. M. *et al.* DAXX promotes centromeric stability independently of ATRX by preventing the accumulation of R-loop-induced DNA double-stranded breaks. **Nucleic acids research**, v. 52, n. 3, p. 1136-1155, 2024.
- PEARSE, A. G. E. Histochemistry, theoretical and applied. **London**, v. 1, p. 666, 1960.
- PROVASE, M. *et al.* Effects of mercury at field estimated concentration in brain of *Bombus atratus* (Hymenoptera: Bombini). **Chemosphere**, v. 276, p. 130198, 2021.
- PROVASE, M. *et al.* Impact of environmental concentrations of fipronil on DNA integrity and brain structure of *Bombus atratus* bumblebees. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 110, p. 104536, 2024.
- RALTON, J. E.; SERNEE, M. F.; MCCONVILLE, M. J. Evolution and function of carbohydrate reserve biosynthesis in parasitic protists. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 988-1001, 2021.
- REIS, A. B. *et al.* Exploring the effects of the acaricide cyflumetofen on the vital organs of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) workers. **Science of the Total Environment**, v. 929, p. 172640, 2024.
- RENNE, M. F.; HARIRI, H. Lipid droplet-organelle contact sites as hubs for fatty acid metabolism, trafficking, and metabolic channeling. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 726261, 2021.
- RIBBLE, D. *et al.* A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC biotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2005.
- RIZZI, G. M. *et al.* Morphological characterization of the gonads of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Journal of Morphological Sciences**, v. 32, n. 04, p. 245-252, 2015.

ROMER, F.; EMMERICH, H.; NOWOCK, J. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor* in vitro. **Journal of insect physiology**, v. 20, n. 10, p. 1975-1987, 1974.

SCOFIELD, S. L.; AMDAM, G. V. Fat body lipogenic capacity in honey bee workers is affected by age, social role and dietary protein. **Journal of Experimental Biology**, v. 227, n. 18, p. jeb247777, 2024.

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. Badajoz: Formatex Research Center**, p. 696-703, 2012.

SINGH, Narendra P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SKOWRONEK, P.; WÓJCIK, Ł.; STRACHECKA, A. Fat body—Multifunctional insect tissue. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 547, 2021.

SOUDERS II, C. L. *et al.* Mitochondrial and transcriptome responses in rat dopaminergic neuronal cells following exposure to the insecticide fipronil. **Neurotoxicology**, v. 85, p. 173-185, 2021.

STONER, K. A.; EITZER, B. D. Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77550, 2013.

SULE, R. O.; CONDON, L.; GOMES, A. V. A common feature of pesticides: oxidative stress—the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, n. 1, p. 5563759, 2022.

SURYADEVARA, V. *et al.* SenNet recommendations for detecting senescent cells in different tissues. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 25, n. 12, p. 1001-1023, 2024.

SYROMYATNIKOV, Mikhail Y. *et al.* Method for detection of mtDNA damages for evaluating of pesticides toxicity for bumblebees (*Bombus terrestris L.*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 169, p. 104675, 2020.

TADEI, R. *et al.* Effect of neonicotinoid and fungicide strobilurin in neotropical solitary bee *Centris analis*. **Environmental Pollution**, v. 360, p. 124712, 2024.

TUTUN, H.; SEVIN, S.; ÇETINTAV, B. Effects of different chilling procedures on honey bees (*Apis mellifera*) for anesthesia. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 67, n. 3, p. 289-294, 2020.

UEDA, Maya. Alkali comet assay in genotoxicity tests. In: **DNA Electrophoresis: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 73-78.

VARDANIS, A. Glycogen synthesis in the insect fat body. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects**, v. 73, n. 4, p. 565-573, 1963.

VILLAR, S.; OJEDA, P. Measurement of genetic damage in *Apis mellifera* caused by agrochemicals using comet assay. **Toxicology**, v. 15, 2019.

VIOTTI, M. H. *et al.* Increased caspase-3 immunoexpression and morphology alterations in oenocytes and trophocytes of *Apis mellifera* larvae induced by toxic secretion of *Epormenis cestri*. **Journal of Apicultural Science**, v. 65, n. 1, p. 101-108, 2021.

WAINWRIGHT, M. Acridine a neglected antibacterial chromophore. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 2001.

WALLIG, M. A.; JANOVITZ, E. B. Morphologic manifestations of toxic cell Injury. In: **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. Academic Press, 2022. p. 113-148.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN J. R, L. A.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15217, 2017.

4. CAPÍTULO FINAL

4.1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atual pesquisa representa uma tentativa para reforçar a conscientização da importância das abelhas do gênero *Bombus*. O trabalho aponta a necessidade de revisão constante das regulamentações de agrotóxicos, e reforça a necessidade de estudos relacionados com efeitos subletais de agrotóxicos sobre as espécies de abelhas nativas. A reformulação de políticas públicas também é essencial e necessária para proteção dessas abelhas, como a proibição do fipronil em pulverizações recentemente instituída (IBAMA, 2024). Os agroquímicos podem ser úteis para o controle de pragas e de plantas invasoras (Bennion *et al.*, 2020), mas devem ser substituídos por práticas sustentáveis sempre que possível (Peterson *et al.*, 2020).

O declínio de populações de abelhas é atribuído atualmente a utilização de forma intensiva de agrotóxicos em áreas agrícolas como uma das principais causas (Macphail; Richardson; Colla, 2019; Wagner, 2020). As pesquisas atuais com análises de doses subletais de agrotóxicos possibilitam estimar desvios energéticos no organismo dos polinizadores para compensar o efeito, o tempo e o tipo de exposição (NOGUEIRA *et al.*, 2019). A análise das células do SHN foi importante para demonstrar os efeitos da exposição de doses subletais de fipronil encontradas em campo. As concentrações de fipronil analisadas na pesquisa ($1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$, e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$) foram prejudiciais para as células do SHN de operárias forrageiras de *B. atratus*. O trabalho evidenciou a sensibilidade de *B. atratus* expostas ao fipronil, e que possivelmente essas doses podem afetar a aptidão das abelhas no ambiente natural. Se as exposições permanecerem a longo prazo, é possível que as concentrações subletais de fipronil no ambiente afetem *B. atratus* em nível populacional.

Os efeitos subletais do fipronil foram prejudiciais para todos os grupos celulares analisados na pesquisa. Todas as concentrações subletais analisadas apresentaram capacidade para causar algum nível de danos para as células do SHN, com efeitos mais brandos para exposição de $1,5 \mu\text{L L}^{-1}$, e com danos mais intensos em $2,5 \mu\text{L L}^{-1}$, e $3,5 \mu\text{L L}^{-1}$, demonstrando o efeito toxicológico do fipronil para *B. atratus*. As concentrações analisadas causaram danos para as estruturas celulares, de forma que o tamanho celular também sofreu alteração, evidenciando que a funcionalidade e integridade das células foram prejudicadas. Os danos ao material genético deixaram evidentes as alterações

cromossômicas, de forma a prejudicar todos os mecanismos de controle celular realizado pelo DNA. A análise dos conteúdos energéticos demonstrou que o fipronil foi capaz de prejudicar as atividades metabólicas das abelhas expostas, que poderia prejudicar a manutenção homeostática das abelhas. Não foi possível realizar todas as análises para esclarecer os processos envolvidos com a alteração de conteúdos energéticos das células, pois análises bioquímicas seriam necessárias, e a atual pesquisa baseou-se nas análises a nível celular. A atividade de enzimas mitocondriais relacionadas com a metabolização de substâncias poderia estar relacionada com a alteração de conteúdos energéticos observados nas células de indivíduos expostos. A variação do conteúdo energético também poderia estar associada com possíveis danos ao intestino médio das abelhas expostas ao fipronil. No entanto, a atual pesquisa baseou-se apenas nos efeitos sobre as células do SHN, e as lacunas que permaneceram incompreensíveis podem ser esclarecidas e retomadas em futuros trabalhos.

O atual trabalho contribuiu para esclarecer os impactos causados pela ação do fipronil sobre as abelhas nativas do gênero *Bombus*, demonstrando que a substância pode apresentar potencial para prejudicar a aptidão, e desta forma, a polinização de espécies vegetais nos ecossistemas. O trabalho contribuiu com resultados inéditos e forneceu importantes informações sobre o efeito subletal do fipronil sobre *B. atratus*.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-nephrotoxic system: A novel model of biomarkers for analysis of the ecology of stress in environmental biomonitoring. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132349, 2015.
- ABDALLA, F. C. *et al.* Effect of cadmium on worker ovary morphology of *Bombus morio* (Hymenoptera: Bombini). **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 28-37, 2018.
- ABROL, D. P.; MONDAL, Amit; SHANKAR, Uma. Importance of bumblebees for crop pollination and food security. **Journal of Palynology**, v. 57, p. 9-37, 2021.
- ADAMEYKO, K. I. *et al.* Conservative and atypical ferritins of sponges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8635, 2021.
- AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical chemistry**, v. 238, p. 1-7, 2018.
- AHN, S.; VOGEL, H.; HECKEL, D. G. Comparative analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family in insects. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 2, p. 133-147, 2012.
- AIZEN, M. A. *et al.* Coordinated species importation policies are needed to reduce serious invasions globally: The case of alien bumblebees in South America. **Journal of Applied Ecology**, v. 56, n. 1, p. 100-106, 2019.
- ALIYEVA, S. B.; AZIZKHANLI, S. A. Acridine Orange and Its Removal from Aqueous Solutions by Adsorption. **Separation & Purification Reviews**, p. 1-32, 2024.
- ALTHAUS, S. L. *et al.* No buzz for bees: Media coverage of pollinator decline. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 2, p. e2002552117, 2021.
- AMINI-ESFIDVAJANI, M. *et al.* Effect of nano-particles of zinc oxide and selenium on antioxidant status, aminotransferase enzymes activities and genes expression of sod-1 and vg in honey bee during the hot season. **Journal of Trace Elements and Minerals**, v. 2, p. 100034, 2022.
- ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R.O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 560, n. 1, p. 57-67, 2004.
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annual review of entomology**, v. 55, n. 1, p. 207-225, 2010.
- AROWOLO, A. O. *et al.* Assessing changes in the value of ecosystem services in response to land-use/land-cover dynamics in Nigeria. **Science of the total Environment**, v. 636, p. 597-609, 2018.
- ASSIS, J. C. *et al.* Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). **Environmental Pollution**, v. 304, p. 119140, 2022.
- ASTOLFI, A. *et al.* Field relevant doses of the fipronil affects gene expression in honey bees *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 53, n. 6, p. 69, 2022.

AVICOR, S. W. *et al.* Contact toxicity and proximate effect of fipronil on insect pest and predatory ant community structure in cocoa agro-ecosystem. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 14, p. 100909, 2023.

AZPIAZU, C. *et al.* Description and validation of an improved method to feed solitary bees (*Osmia* spp.) known amounts of pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 264, p. 115398, 2023.

BAENA-DÍAZ, F. *et al.* *Apis mellifera* in Mexico: honey production, melliferous flora and pollination aspects. Review. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 13, n. 2, p. 525-548, 2022.

BALLARIN, C. S. *et al.* How many animal-pollinated angiosperms are nectar-producing? **New Phytologist**, v. 243, n. 5, p. 2008-2020, 2024.

BÁLSAMO, P. J. *et al.* Impact of sublethal doses of thiamethoxam and *Nosema ceranae* inoculation on the hepato-nephrocytic system in young Africanized *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 350-361, 2020.

BASF S.A.: Tuit® Florestal: Fipronil. **BASF**. São Paulo, [21 mai. 2024]. Disponível em: <https://agriculture.basf.com/br/pt/protecao-de-cultivos-e-sementes/produtos/tuit-florestal>. Acesso em: 15 mai. 2025.

BEDNÁŘOVÁ, A.; KODRÍK, D.; KRISHNAN, N. Unique roles of glucagon and glucagon-like peptides: Parallels in understanding the functions of adipokinetic hormones in stress responses in insects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 1, p. 91-100, 2013.

BELSKY, J. E.; CAMP, A. A.; LEHMANN, D. M. The importance of males to bumble bee (*Bombus* species) nest development and colony viability. **Insects**, v. 11, n. 8, p. 506, 2020.

BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current opinion in insect science**, v. 10, p. 51-58, 2015.

BERNAL, J. *et al.* Overview of pesticide residues in stored pollen and their potential effect on bee colony (*Apis mellifera*) losses in Spain. **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 6, p. 1964-1971, 2010.

BHATT, P. *et al.* Insights into the toxicity and biodegradation of fipronil in contaminated environment. **Microbiological research**, v. 266, p. 127247, 2023.

BLASCO-LAVILLA, N. *et al.* Infection by *Crithidia bombi* increases relative abundance of *Lactobacillus* spp. in the gut of *Bombus terrestris*. **Molecular Ecology**, v. 33, n. 17, p. e17478, 2024.

BLOOMQUIST, J.R. Insecticides: chemistries and characteristics. Flórida: [s.n.], 2015. Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/bloomquist-insecticides>>. Acesso em: 18 sep. 2020.

BOEING, G. A. N. S. *et al.* Genotoxic effect of two environmentally safe doses of cadmium on the hepato-nephrocytic system of *Bombus atratus* forager workers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 108, p. 104450, 2024.

BORSUK, G. *et al.* Capacity of honeybees to remove heavy metals from nectar and excrete the contaminants from their bodies. **Apidologie**, p. 1-14, 2021.

- BRASIL, L. S. *et al.* Aquatic insects and their environmental predictors: a scientometric study focused on environmental monitoring in lotic environmental. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 3, p. 194, 2020.
- BREJCHA, M. *et al.* Seasonal changes in ultrastructure and gene expression in the fat body of worker honey bees. **Journal of insect physiology**, v. 146, p. 104504, 2023.
- BUCHHOLZ, S.; EGERER, M. H. Functional ecology of wild bees in cities: towards a better understanding of trait-urbanization relationships. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 9, p. 2779-2801, 2020.
- BUMBLEBEE, ACUTE ORAL TOXICITY TEST. **OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS**. 2017.
- BYVALTSEV, V. A. *et al.* Acridine orange: a review of novel applications for surgical cancer imaging and therapy. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 925, 2019.
- CAMERON, S. A. *et al.* Patterns of widespread decline in North American bumble bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 2, p. 662-667, 2011.
- CAMERON, S. A.; SADD, B. M. Global trends in bumble bee health. **Annual review of entomology**, v. 65, n. 1, p. 209-232, 2020.
- CARNEIRO, L. S. *et al.* Effects of the insecticide imidacloprid on the post-embryonic development of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 905, p. 167278, 2023.
- CARVALHO, F. G. *et al.* Acute fipronil toxicity induces high mortality rate for honeybees and stingless bees, with the latter facing heightened risk. **Apidologie**, v. 55, n. 5, p. 64, 2024.
- CASTILHOS, D. *et al.* Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. **Apidologie**, v. 50, p. 263-272, 2019.
- CATANIA, R. *et al.* Are botanical biopesticides safe for bees (Hymenoptera, Apoidea)? **Insects**, v. 14, n. 3, p. 247, 2023.
- CCAB Agro S.A. Fipronil CCAB 800 Wg. **CCAB**. São Paulo, [s.d.]. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-05/fipronilccab800wg.pdf. Acesso em: 7 mai. 2025.
- CESCHI-BERTOLI, L. *et al.* Comet assay protocol for *Bombus atratus* fat body and pericardial cells (Hymenoptera, bombini) at a safe concentration of mercury. **Chemosphere**, v. 261, p. 127752, 2020.
- CHAITANYA, P. *et al.* Development of smart pesticide spraying robot. **International Journal of Recent Technology and Engineering**, v. 8, n. 5, p. 2193-2202, 2020.
- CHAPMAN, R. F.; SIMPSON, S. J.; DOUGLAS, A. E., 2013. The Insects Structure and Function, fifth ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- CHOHAN, K. R.; GRIFFIN, J. T.; CARRELL, D. T. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. **Andrologia**, v. 36, n. 5, p. 321-326, 2004.
- CHOWDHURY, S. *et al.* Insects as bioindicator: A hidden gem for environmental monitoring. **Frontiers in environmental science**, v. 11, 2023.

- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.
- COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**. Elsevier BV [s.l.], v. 1840, n. 2, p.794-800, fev. 2014.
- COLLINS, A. *et al.* Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. **Nature protocols**, v. 18, n. 3, p. 929-989, 2023.
- COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **NRC: Biological markers in environmental health research**, 1987.
- COSTA, S.; TEIXEIRA, J. P. Comet assay. In: **Encyclopedia of Toxicology: Third Edition**. Elsevier, 2014. p. 1020-1023.
- CRAILSHEIM, K. Intestinal transport of sugars in the honeybee (*Apis mellifera L.*). **Journal of insect physiology**, v. 34, n. 9, p. 839-845, 1988.
- CROWTHER, L. P. *et al.* Spatial ecology of a range-expanding bumble bee pollinator. **Ecology and evolution**, v. 9, n. 3, p. 986-997, 2019.
- CUEVA DEL CASTILLO, R. *et al.* On the evolution of body size and of sexual dimorphism in corbiculate bees. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 3, p. 348-363, 2024.
- DARRAGH, K.; NELSON, D. R.; RAMÍREZ, S. R. The birth-and-death evolution of cytochrome P450 genes in bees. **Genome biology and evolution**, v. 13, n. 12, p. evab261, 2021.
- DARZYNKIEWICZ, Z. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. In: **Methods in cell biology**. Academic Press, 1990. p. 285-298.
- DECOURTYE, A. *et al.* Decision-making criteria for pesticide spraying considering the bees' presence on crops to reduce their exposure risk. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 1062441, 2023.
- DEMARINI, David M. The role of genotoxicity in carcinogenesis. 2021.
- DESCAMPS, C. *et al.* Warm temperatures reduce flower attractiveness and bumblebee foraging. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 493, 2021.
- DI FIORE, C. *et al.* Honeybees as bioindicators of heavy metal pollution in urban and rural areas in the South of Italy. **Atmosphere**, v. 13, n. 4, p. 624, 2022.
- DIMAURO, I. *et al.* A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. **BMC research notes**, v. 5, p. 1-5, 2012.
- DOMINGUES, C. E. C. *et al.* Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.
- EKKA, A. *et al.* Anthropogenic modifications and river ecosystem services: a landscape perspective. **Water**, v. 12, n. 10, p. 2706, 2020.

- ELLMAN, B. *et al.* # Buzz: exploring public interest in pollinators, bees, and honey using online media data. **Telematics and Informatics**, v. 82, p. 102000, 2023.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance fipronil. **EFSA Journal**, v. 11, n. 5, p. 3158, 2013.
- EVANS, J. D.; CHEN, Y. Colony collapse disorder and honey bee health. **Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner**, p. 229-234, 2021.
- FADHILAH, A.; GABBAR, A.; BOKHARI, A. A. Microsporidium. **StatPearls**, 2023.
- FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 774, p. 145679, 2021.
- FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Fipronil exposure compromises respiration and damages the Malpighian tubules of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 58, p. 88101-88108, 2022.
- FARDER-GOMES, C. F. *et al.* Exposure to sublethal concentrations of imidacloprid, pyraclostrobin, and glyphosate harm the behavior and fat body cells of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Science of The Total Environment**, v. 907, p. 168072, 2024.
- FELDHAAR, H.; OTTI, O. Pollutants and their interaction with diseases of social Hymenoptera. **Insects**, v. 11, n. 3, p. 153, 2020.
- FIJEN, T. P. M. *et al.* Insect pollination is at least as important for marketable crop yield as plant quality in a seed crop. **Ecology letters**, v. 21, n. 11, p. 1704-1713, 2018.
- GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.
- GASTELBONDO-PASTRANA, B. I. *et al.* The comet assay in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae): A suitable approach for detecting somatic and germ cell genotoxicity induced by agrochemicals. **Chemosphere**, v. 235, p. 70-75, 2019.
- GÉRARD, M. *et al.* Elevated developmental temperatures impact the size and allometry of morphological traits of the bumblebee *Bombus terrestris*. **Journal of Experimental Biology**, v. 226, n. 8, p. jeb245728, 2023.
- GHISBAIN, G. *et al.* Expanding insect pollinators in the Anthropocene. **Biological Reviews**, v. 96, n. 6, p. 2755-2770, 2021.
- GISDER, S. *et al.* Rapid gastrointestinal passage may protect *Bombus terrestris* from becoming a true host for *Nosema ceranae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 12, p. e00629-20, 2020.
- GRAVES, T. A. *et al.* Western bumble bee: declines in the continental United States and range-wide information gaps. **Ecosphere**, v. 11, n. 6, p. e03141, 2020.
- GREGORC, A. *et al.* Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. **Chemosphere**, v. 147, p. 328-336, 2016.

GRIGORAKI, L. *et al.* Cuticular hydrocarbon biosynthesis in malaria vectors: Insights from the adult oenocyte transcriptome. **bioRxiv**, p. 2020.04. 28.065938, 2020.

GROSSO, C. G. *et al.* Identification of three cytochrome P450 genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: Expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 44, p. 459-470, 2016.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A Comprehensive Review on Clinical Applications of Comet Assay. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, JCDR Research and Publications [s.l.], p.1-5, 2015

HAAS, J.; NAUEN, R. Pesticide risk assessment at the molecular level using honey bee cytochrome P450 enzymes: A complementary approach. **Environment International**, v. 147, p. 106372, 2021.

HAAS, J. *et al.* Phylogenomic and functional characterization of an evolutionary conserved cytochrome P450-based insecticide detoxification mechanism in bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 26, p. e2205850119, 2022.

HAFEEZ, A. *et al.* Implementation of drone technology for farm monitoring & pesticide spraying: A review. **Information processing in Agriculture**, v. 10, n. 2, p. 192-203, 2023.

HAUNERLAND, N. H.; SHIRK, P. D. Regional and functional differentiation in the insect fact body. **Annual Review of Entomology**, v. 40, n. 1, p. 121-145, 1995.

HANBERRY, B. B. *et al.* Pollinators of the Great Plains: disturbances, stressors, management, and research needs. **Rangeland Ecology & Management**, v. 78, p. 220-234, 2021.

HARWOOD, G.; AMDAM, G. Vitellogenin in the honey bee midgut. **Apidologie**, v. 52, n. 4, p. 837-847, 2021.

HAYWARD, A. *et al.* A cytochrome P450 insecticide detoxification mechanism is not conserved across the Megachilidae family of bees. **Evolutionary Applications**, v. 17, n. 1, p. e13625, 2024.

HE, B. *et al.* Pesticides-induced energy metabolic disorders. **Science of The Total Environment**, v. 729, p. 139033, 2020.

HEIER, C.; KÜHNLEIN, R. P. Triacylglycerol metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 210, n. 4, p. 1163-1184, 2018.

HENNIG, T. B. *et al.* A systematic review of the toxic effects of a nanopesticide on non-target organisms: Estimation of protective concentrations using a species sensitivity distribution (SSD) approach–The case of atrazine. **Science of the Total Environment**, v. 871, p. 162094, 2023.

HERBERTSSON, L. *et al.* Long-term data shows increasing dominance of *Bombus terrestris* with climate warming. **Basic and Applied Ecology**, v. 53, p. 116-123, 2021.

HOLDER, P. J. *et al.* Fipronil pesticide as a suspect in historical mass mortalities of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 51, p. 13033-13038, 2018.

HRISTOV, P. *et al.* Honey bee colony losses: Why are honey bees disappearing? **Sociobiology**, v. 68, n. 1, p. e5851-e5851, 2021.

- HSU, C.; WENG, Y. Long-term inhibition of ferritin synthesis in trophocytes and oenocytes by ferritin double-stranded RNA ingestion to investigate the mechanisms of magnetoreception in honey bees (*Apis mellifera*). **Plos one**, v. 16, n. 8, p. e0256341, 2021.
- HUANG, K. *et al.* RiboTag translomic profiling of *Drosophila* oenocytes under aging and induced oxidative stress. **BMC genomics**, v. 20, p. 1-19, 2019.
- IBAMA. [Ibama Suspende Cautelamente Aplicação de Agrotóxicos à Base de Fipronil]. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/notas/2024/ibama-suspende-cautelamente-aplicacao-de-agrotoxicos-a-base-de-fipronil>. Acesso em: 14 jan. 2025.
- INOUE, L. V. B. *et al.* Harmful effects of pyraclostrobin on the fat body and pericardial cells of foragers of africanized honey bee. **Toxics**, v. 10, n. 9, p. 530, 2022.
- JANOUSEK, W. M. *et al.* Recent and future declines of a historically widespread pollinator linked to climate, land cover, and pesticides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 5, p. e2211223120, 2023.
- JHA, S. Contemporary human-altered landscapes and oceanic barriers reduce bumble bee gene flow. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 5, p. 993-1006, 2015.
- KAABECHE, M. *et al.* Cardiotoxicity of the diamide insecticide chlorantraniliprole in the intact heart and in isolated cardiomyocytes from the honey bee. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 14938, 2024.
- KAIRO, G. *et al.* Assessment of the toxic effect of pesticides on honey bee drone fertility using laboratory and semifield approaches: A case study of fipronil. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 9, p. 2345-2351, 2017.
- KARPOVA, E. K. *et al.* Stress-related hormones affect carbohydrate metabolism in *Drosophila* females. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 1, p. e21540, 2019.
- KATUMO, D. M. *et al.* Pollinator diversity benefits natural and agricultural ecosystems, environmental health, and human welfare. **Plant Diversity**, v. 44, n. 5, p. 429-435, 2022.
- KAYA, M. Y.; GÜLTEKIN, Y. S.; GÜLTEKIN, P. Evaluation of Honey Bees within the Scope of Sustainable Development Goals and Ecosystem Services. **Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, v. 11, n. 5, p. 2397-2408. 2023
- KEELEY, L. L. Physiology and biochemistry of the fat body. **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**, v. 3, p. 211-248, 1985.
- KHALIFA, S. A. M. *et al.* Overview of bee pollination and its economic value for crop production. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 688, 2021.
- KHATRI, N.; TYAGI, S.; RAWTANI, D. Rural environment study for water from different sources in cluster of villages in Mehsana district of Gujarat. **Environmental monitoring and assessment**, v. 190, p. 1-20, 2018.
- KLEIN, S. *et al.* Why bees are so vulnerable to environmental stressors. **Trends in ecology & evolution**, v. 32, n. 4, p. 268-278, 2017.
- KOSTJUKOVA, L. O.; LEONTIEVA, S. V.; KOSTJUKOV, V. V. The vibronic absorption spectra and electronic states of acridine orange in aqueous solution. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 249, p. 119302, 2021.

- KOVALSKYI, Y.; ZHMUR, V. Features of fat body development in the body of honey bees. **Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Agricultural sciences**, v. 26, n. 100, p. 179-183, 2024.
- KRECHEMER, F. S.; MARCHIORO, C. A.; BUTT, N. Past, present and future distributions of bumblebees in South America: identifying priority species and areas for conservation. **Journal of Applied Ecology**, v. 57, n. 9, 2020.
- KULYK, O. G. *et al.* Novel dimeric dyes based on the acridine orange chromophore: Synthesis, characterization and application in real-time PCR. **Dyes and Pigments**, v. 200, p. 110148, 2022.
- KUSUZAKI, K. *et al.* Intraoperative Photodynamic Surgery (iPDS) with acridine orange for musculoskeletal sarcomas. **Cureus**, v. 6, n. 9, 2014.
- LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, n. 1, p. 231-253, 2007.
- LICZNER, A. R. The Conservation Management and Ecology of Northeastern North American Bumble Bees. 2020.
- LIMA, M. A. P. *et al.* Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, p. 733-747, 2016.
- LISON, L. Sur de nouveaux colorants histologiques spécifiques des lipides. **Compt Rend Soc Biol**, v. 115, p. 202-205, 1934.
- LIU, H. *et al.* Dietary insect powder protein sources improve protein utilization by regulation on intestinal amino acid-chemosensing system. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1590, 2020.
- LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 89, n. 4, p. 595-645, 1988.
- LU, C. *et al.* The trophocytes and oenocytes of worker and queen honey bees (*Apis mellifera*) exhibit distinct age-associated transcriptome profiles. **GeroScience**, v. 43, n. 4, p. 1863-1875, 2021.
- MACINNIS, G.; FORREST, J. R. K. Field design can affect cross-pollination and crop yield in strawberry (*Fragaria x ananassa* D.). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 289, p. 106738, 2020.
- MACKENZIE, E. L.; GOULSON, D.; ROTHERAY, E. L. Investigating the foraging, guarding and drifting behaviors of commercial *Bombus terrestris*. **Journal of insect behavior**, v. 34, n. 5, p. 334-345, 2021.
- MCMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, v. 158, n. 4006, p. 202-202, 1946.
- MAEBE, K. *et al.* Bumblebee resilience to climate change, through plastic and adaptive responses. **Global change biology**, v. 27, n. 18, p. 4223-4237, 2021.

- MAIN, A. R. *et al.* Beyond neonicotinoids—wild pollinators are exposed to a range of pesticides while foraging in agroecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 742, p. 140436, 2020.
- MARGARITA, O.; OSNAT, M.; ABRAHAM, H. Choosing the best: honeybee workers can assess reproductive quality of the queen through pheromonal signalling in simultaneous choice assays. **Apidologie**, v. 51, p. 291-306, 2020.
- MARGOTTA, J. W.; ROBERTS, S. P.; ELEKONICH, M. M. Effects of flight activity and age on oxidative damage in the honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 14, p. jeb183228, 2018.
- MARTELLI, F. *et al.* Worker bees (*Apis mellifera*) deprived of pollen in the first week of adulthood exhibit signs of premature aging. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, p. 103774, 2022.
- MARTIN, C. D. *et al.* Busier bees: increasing nest traffic in commercial bumblebee colonies. **Journal of Pollination Ecology**, v. 25, p. 7-15, 2019.
- MARTINET, B. *et al.* Description of nest architecture and ecological notes on the bumblebee *Bombus (Pyrobombus) lapponicus* (Hymenoptera: Apidae: Bombini). **Insectes Sociaux**, v. 69, n. 1, p. 131-135, 2022.
- MARTINEZ, A.; CALHOUN, A. C.; SADD, B. M. Investigating the influence of diet diversity on infection outcomes in a bumble bee (*Bombus impatiens*) and microsporidian (*Nosema bombi*) host-pathogen system. **Frontiers in Insect Science**, v. 3, p. 1207058, 2023.
- MASIH, S. C. Impact of Monocrotophos pesticide on serum biochemical profile in freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton, 1822). 2021.
- MITKOVSKA, V. *et al.* Sperm comet assay as a novel tool in assessing genotoxicity in high-mortality honey bee (*Apis mellifera*) populations. **Apidologie**, v. 56, n. 1, p. 1-12, 2025.
- MØLLER, P. *et al.* Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. **Nature protocols**, v. 15, n. 12, p. 3817-3826, 2020.
- MORRIS, Brian. *Insects and human life*. Routledge, 2020.
- MULLINS, J. L.; STRANGE, J. P.; TRIPODI, A. D. Why are queens broodless? Failed nest initiation not linked to parasites, mating status, or ovary development in two bumble bee species of *Pyrobombus* (Hymenoptera: Apidae: Bombus). **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 2, p. 575-581, 2020.
- MULVEY, J.; CRESSWELL, J. E. Time-dependent effects on bumble bees of dietary exposures to farmland insecticides (imidacloprid, thiamethoxam and fipronil). **Pest Management Science**, v. 76, n. 8, p. 2846-2853, 2020.
- NAHARKI, K.; REGMI, S. Risk assessment of pesticidal toxicity and threats on pollinators: A review on honey bee. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, v. 8, n. 12, p. 2556-2561, 2020.
- NAUEN, R.; JESCHKE, P. Basic and applied aspects of neonicotinoid insecticides. **Green trends in insect control**, v. 1, p. 132-162, 2011.

NELSON, J. M.; SAUNDERS, C. J.; JOHNSON, E. C. The intrinsic nutrient sensing adipokinetic hormone producing cells function in modulation of metabolism, activity, and stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, p. 7515, 2021.

NEGRI, I. *et al.* Honey bees (*Apis mellifera*, L.) as active samplers of airborne particulate matter. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0132491, 2015.

NICEWICZ, Ł. *et al.* Set of stress biomarkers as a practical tool in the assessment of multistress effect using honeybees from urban and rural areas as a model organism: a pilot study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 9084-9096, 2021.

NOGUEIRA, F. L. A. *et al.* Exposure to mercury at trace concentrations leads to collapse of the hepato-nephrotoxic system in two neotropical species of bumblebee. **Am. J. Agric. Biol. Sci.**, v. 14, p. 1-10, 2019.

NORTOX S.A.: Fipronil Nortox 800 Wg. **NORTOX**. Arapongas, [24 fev. 2024]. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/2023-05/fipronilnortox800wg.pdf. Acesso em: 7 mai. 2025.

OECD (1998a) Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals: honeybees, acute oral toxicity test. Environmental health safety division, Organisation for Economic Co-operation and Development - Number 213. Paris, France. https://www.oecdilibrary.org/environment/test-no-213-honeybeesacute-oral-toxicity-test_9789264070165-em

OECD (1998b) Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals: honeybees, acute contact toxicity test. Environmental health safety division, Organisation for Economic Co-operation and Development - Number 214. Paris, France. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-214-honeybees-acutecontact-toxicity-test_9789264070189-em

OECD, 2017a. Guidelines for the Testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Bumblebee. Acute Contact Toxic. Test. N. 246.

OECD, 2017b. Bumblebee, Acute Oral Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Test No. 247: OECD Publishing, Paris.

OLIVEIRA, V. T. P.; CRUZ-LANDIM, C. Morphology and function of insect fat body cells: a review. **Biociências (On-line)**, v. 11, n. 2, 2003.

OLIVEIRA, M. O. *et al.* Evidence of Nest Reactivation and Perennial Colonies in the Neotropical Bumble Bee *Bombus brevivillus* (Hymenoptera: Apidae: Bombini). **Neotropical Entomology**, v. 51, n. 6, p. 886-893, 2022.

ÖSTLING, O., JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 123:291–8, 1984

PAOLI, M.; GALIZIA, G. C. Olfactory coding in honeybees. **Cell and Tissue Research**, v. 383, n. 1, p. 35-58, 2021.

PARDO, A.; BORGES, P. A. V. Worldwide importance of insect pollination in apple orchards: A review. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 293, p. 106839, 2020.

- PARIKH, G.; RAWTANI, D.; KHATRI, N. "Insects As An Indicator For Environmental Pollution". **Environmental claims journal**, v. 33, n. 2, p. 161–181, 2021.
- PASCALL, David J. *et al.* Virus prevalence and genetic diversity across a wild bumblebee community. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 650747, 2021.
- PEARSE, A. G. E. Histochemistry, theoretical and applied. **London**, v. 1, p. 666, 1960.
- PEREIRA, A. K. S. *et al.* The socio-environmental and human health problems related to the use of pesticides and the use of advanced oxidative processes for their degradation: Brazil. **Water**, v. 15, n. 8, p. 1608, 2023.
- PEROBELLI, J. E. Pesticides and public health: discussing risks in Brazilian agro-industrial growth. **Frontiers in Toxicology**, v. 7, p. 1442801, 2025.
- PELLECCHIA, M.; NEGRI, I. Particulate matter collection by honey bees (*Apis mellifera*, L.) near to a cement factory in Italy. **PeerJ**, v. 6, p. e5322, 2018.
- PINO-OTÍN, M. R. *et al.* Effects of the insecticide fipronil in freshwater model organisms and microbial and periphyton communities. **Science of the Total Environment**, v. 764, p. 142820, 2021.
- PINTO, L. M. *et al.* DAXX promotes centromeric stability independently of ATRX by preventing the accumulation of R-loop-induced DNA double-stranded breaks. **Nucleic acids research**, v. 52, n. 3, p. 1136-1155, 2024.
- PISA, L. *et al.* An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 2: impacts on organisms and ecosystems. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 11749-11797, 2021.
- POLIDORI, C.; FERRARI, A.; RONCHETTI, F. Biology and Behaviour of European Wild Bees. In: **Hidden and Wild: An Integrated Study of European Wild Bees**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2025. p. 49-118.
- PRAKASH, S. Climate change and need of biodiversity conservation: A review. **International Journal of Applied Research**, v. 3, n. 12, p. 554-557, 2017.
- PRAKASH, S. Impact of Climate change on Aquatic Ecosystem and its Biodiversity: An overview. **International Journal of Biological Innovations**, v. 3, n. 2, 2021.
- PRAKASH, S.; VERMA, A. K. Anthropogenic activities and Biodiversity threats. **International Journal of Biological Innovations, IJBI**, v. 4, n. 1, p. 94-103, 2022.
- PRINCEN, S. A. *et al.* Worker dominance and reproduction in the bumblebee *Bombus terrestris*: when does it pay to bare one's mandibles? **Animal behaviour**, v. 166, p. 41-50, 2020.
- PROVASE, M. *et al.* Effects of mercury at field estimated concentration in brain of *Bombus atratus* (Hymenoptera: Bombini). **Chemosphere**, v. 276, p. 130198, 2021.
- PROVASE, M. *et al.* Impact of environmental concentrations of fipronil on DNA integrity and brain structure of *Bombus atratus* bumblebees. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 110, p. 104536, 2024.
- RADER, R. *et al.* Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 1, p. 146-151, 2016.

RALTON, J. E.; SERNEE, M. F.; MCCONVILLE, M. J. Evolution and function of carbohydrate reserve biosynthesis in parasitic protists. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 988-1001, 2021.

REIS, A. B. *et al.* Exploring the effects of the acaricide cyflumetofen on the vital organs of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) workers. **Science of the Total Environment**, v. 929, p. 172640, 2024.

RENNE, M. F.; HARIRI, H. Lipid droplet-organelle contact sites as hubs for fatty acid metabolism, trafficking, and metabolic channeling. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, p. 726261, 2021.

REVERTE, F. C. *et al.* Assessment of impacts on ecosystem services provided by geodiversity in highly urbanised areas: A case study of the Taubaté Basin, Brazil. **Environmental Science & Policy**, v. 112, p. 91-106, 2020.

RIBBLE, D. *et al.* A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC biotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2005.

RIVEROS, A. J.; GRONENBERG, W. The flavonoid rutin protects the bumble bee *Bombus impatiens* against cognitive impairment by imidacloprid and fipronil. **Journal of Experimental Biology**, v. 225, n. 17, p. jeb244526, 2022.

RIZZI, G. M. *et al.* Morphological characterization of the gonads of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). **Journal of Morphological Sciences**, v. 32, n. 04, p. 245-252, 2015.

ROMER, F.; EMMERICH, H.; NOWOCK, J. Biosynthesis of ecdysones in isolated prothoracic glands and oenocytes of *Tenebrio molitor* in vitro. **Journal of insect physiology**, v. 20, n. 10, p. 1975-1987, 1974.

ROSA, M. E. *et al.* Recent advances on the influence of fipronil on insect behavior. **Current Opinion in Insect Science**, p. 101251, 2024.

RUSSELL, K. A.; MCFREDERICK, Q. S. Elevated temperature may affect nectar microbes, nectar sugars, and bumble bee foraging preference. **Microbial Ecology**, v. 84, n. 2, p. 473-482, 2022.

SALVARREY, S. *et al.* Characteristics of the tomato fruit (*Solanum lycopersicum*) using native bumblebees (*Bombus atratus*) as pollinators in greenhouse. **Agrociencia (Uruguay)**, v. 24, n. 1, 2020.

SALVARREY, S. *et al.* Parasites and RNA viruses in wild and laboratory reared bumble bees *Bombus pauloensis* (Hymenoptera: Apidae) from Uruguay. **PLoS One**, v. 16, n. 4, p. e0249842, 2021.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees—a risk assessment. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; WYCKHUYS, K. A. G. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. **Biological conservation**, v. 232, p. 8-27, 2019.

SANG, H. *et al.* Conservation genomics analysis reveals recent population decline and possible causes in bumblebee *Bombus opulentus*. **Insect Science**, v. 31, n. 5, p. 1631-1644, 2024.

- SANNIGRAHI, S. *et al.* Responses of ecosystem services to natural and anthropogenic forcings: A spatial regression based assessment in the world's largest mangrove ecosystem. **Science of the Total Environment**, v. 715, p. 137004, 2020.
- SANTOS, C. F.; OTESBELGUE, A.; BLOCHTEIN, B. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0200286, 2018.
- SCACCABAROZZI, D. *et al.* Evidence of introduced honeybees (*Apis mellifera*) as pollen wasters in orchid pollination. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 14076, 2024.
- SCHEPER, J. *et al.* Biodiversity and pollination benefits trade off against profit in an intensive farming system. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 28, p. e2212124120, 2023.
- SKOWRONEK, P.; WÓJCIK, Ł.; STRACHECKA, A. Fat body—Multifunctional insect tissue. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 547, 2021.
- SCOFIELD, S. L.; AMDAM, G. V. Fat body lipogenic capacity in honey bee workers is affected by age, social role and dietary protein. **Journal of Experimental Biology**, v. 227, n. 18, p. jeb247777, 2024.
- SGOLASTRA, F. *et al.* Combined exposure to sublethal concentrations of an insecticide and a fungicide affect feeding, ovary development and longevity in a solitary bee. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 285, n. 1885, p. 20180887, 2018.
- SGOLASTRA, F. *et al.* Bees and pesticide regulation: lessons from the neonicotinoid experience. **Biological Conservation**, v. 241, p. 108356, 2020.
- SILVA-ZACARIN, E. C. M. *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. Badajoz: Formatex Research Center**, p. 696-703, 2012.
- SINGH, Narendra P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental cell research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.
- SINGH, N. S. *et al.* A comprehensive review of environmental fate and degradation of fipronil and its toxic metabolites. **Environmental Research**, v. 199, p. 111316, 2021.
- SIVITER, H.; BROWN, M. J. F.; LEADBEATER, E. Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. **Nature**, v. 561, n. 7721, p. 109-112, 2018.
- SONIKA, Y. A. H.; Kumar, R. A study on evaluation of environmental effect on honey bee species in Western Himalayan region. **J. Entomol. Res**, 45, 802–806, 2021.
- SOUDERS II, C. L. *et al.* Mitochondrial and transcriptome responses in rat dopaminergic neuronal cells following exposure to the insecticide fipronil. **Neurotoxicology**, v. 85, p. 173-185, 2021.
- STEC, N.; SALEEM, A.; DARVEAU, C. Proline as a Sparker Metabolite of Oxidative Metabolism during the Flight of the Bumblebee, *Bombus impatiens*. **Metabolites**, v. 11, n. 8, p. 511, 2021.
- STEPHENS, R. E. *et al.* Insect pollination for most of angiosperm evolutionary history. **New Phytologist**, v. 240, n. 2, p. 880-891, 2023.

- STONER, K. A.; EITZER, B. D. Using a hazard quotient to evaluate pesticide residues detected in pollen trapped from honey bees (*Apis mellifera*) in Connecticut. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e77550, 2013.
- SUKUMARAN, A.; KHANDURI, V. P.; SHARMA, C. M. Pollinator-mediated self-pollination and reproductive assurance in an isolated tree of *Magnolia grandiflora* L. **Ecological Processes**, v. 9, p. 1-9, 2020.
- SULE, R. O.; CONDON, L.; GOMES, A. V. A common feature of pesticides: oxidative stress - the role of oxidative stress in pesticide-induced toxicity. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, n. 1, p. 5563759, 2022.
- SURYADEVARA, V. *et al.* SenNet recommendations for detecting senescent cells in different tissues. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 25, n. 12, p. 1001-1023, 2024.
- SYAFRUDIN, M. *et al.* Pesticides in drinking water—a review. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 2, p. 468, 2021.
- SYROMYATNIKOV, Mikhail Y. *et al.* Method for detection of mtDNA damages for evaluating of pesticides toxicity for bumblebees (*Bombus terrestris* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 169, p. 104675, 2020.
- SZCZEPANKIEWICZ, A.; SIMICZYJEW, B. Ovary structure and oogenesis in Heteroptera. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 68, n. 3, p. 83-92, 2024.
- TADEI, R. *et al.* Effect of neonicotinoid and fungicide strobilurin in neotropical solitary bee *Centris analis*. **Environmental Pollution**, v. 360, p. 124712, 2024.
- TAYE, R. R. *et al.* Molecular Characterization of Bumble Bees Species from North East Himalayas. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 9, n. 5, p. 2010-2016, 2020.
- TIMERMAN, D.; BARRETT, S. C. H. The biomechanics of pollen release: new perspectives on the evolution of wind pollination in angiosperms. **Biological Reviews**, v. 96, n. 5, p. 2146-2163, 2021.
- TOLEDO-HERNÁNDEZ, E. *et al.* The stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): a review of the current threats to their survival. **Apidologie**, v. 53, n. 1, p. 8, 2022.
- TOMLIN, Clive DS. **The pesticide manual: a world compendium**. 2009.
- TOSELLI, G.; SGOLASTRA, F. Seek and you shall find: An assessment of the influence of the analytical methodologies on pesticide occurrences in honey bee-collected pollen with a systematic review. **Chemosphere**, v. 258, p. 127358, 2020.
- TUDI, M. *et al.* Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.
- TUTUN, H.; SEVIN, S.; ÇETINTAV, B. Effects of different chilling procedures on honey bees (*Apis mellifera*) for anesthesia. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 67, n. 3, p. 289-294, 2020.
- UEDA, Maya. Alkali comet assay in genotoxicity tests. In: **DNA Electrophoresis: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 73-78.

- VARDANIS, A. Glycogen synthesis in the insect fat body. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Specialized Section on Enzymological Subjects**, v. 73, n. 4, p. 565-573, 1963.
- VERMA, O. Climate change and its impacts with special reference to India. In: **Water, Cryosphere, and Climate Change in the Himalayas: A Geospatial Approach**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 39-55.
- VIKRAM, P. R. K. R. Agricultural Robot—A pesticide spraying device. **International Journal of Future Generation Communication and Networking**, v. 13, n. 1, p. 150-160, 2020.
- VILLAR, S.; OJEDA, P. Measurement of genetic damage in *Apis mellifera* caused by agrochemicals using comet assay. **Toxicology**, v. 15, 2019.
- VIOTTI, M. H. *et al.* Increased caspase-3 immunoexpression and morphology alterations in oenocytes and trophocytes of *Apis mellifera* larvae induced by toxic secretion of *Epormenis cestri*. **Journal of Apicultural Science**, v. 65, n. 1, p. 101-108, 2021.
- VOUMIK, L. C.; MIMI, M. B.; RAIHAN, A. Nexus between urbanization, industrialization, natural resources rent, and anthropogenic carbon emissions in South Asia: CS-ARDL approach. **Anthropocene Science**, v. 2, n. 1, p. 48-61, 2023.
- WAINWRIGHT, M. Acridine a neglected antibacterial chromophore. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p. 1-13, 2001.
- WAKGARI, M.; YIGEZU, G. Honeybee keeping constraints and future prospects. **Cogent Food & Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 1872192, 2021.
- WAGNER, D. L. Insect declines in the Anthropocene. **Annual review of entomology**, v. 65, n. 1, p. 457-480, 2020.
- WALLIG, M. A.; JANOVIK, E. B. Morphologic manifestations of toxic cell injury. In: **Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology**. Academic Press, 2022. p. 113-148.
- WILLIAMS, P. H.; JEPSEN, S. IUCN Bumblebee Specialist Group Annual Report 2020. **London: National History Museum**, 2021.
- WINFREE, Rachael *et al.* Species turnover promotes the importance of bee diversity for crop pollination at regional scales. **Science**, v. 359, n. 6377, p. 791-793, 2018.
- XU, X. *et al.* Ecosystem services trade-offs and determinants in China's Yangtze River Economic Belt from 2000 to 2015. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 1601-1614, 2018.
- XU, Y. *et al.* Vibration mechanics involved in buzz pollination lead to size-dependent associations between bumblebees and Pedicularis flowers. **Science China Life Sciences**, p. 1-12, 2025.
- XUN, L. *et al.* Advanced spraying systems to improve pesticide saving and reduce spray drift for apple orchards. **Precision Agriculture**, v. 24, n. 4, p. 1526-1546, 2023.
- YAN, S. *et al.* Simple osthole/nanocarrier pesticide efficiently controls both pests and diseases fulfilling the need of green production of strawberry. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 30, p. 36350-36360, 2021.

YANKIT, P. *et al.* Effect of bumble bee pollination on quality and yield of tomato (*Solanum lycopersicum Mill.*) grown under protected conditions. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 257-263, 2018.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN J. R, L. A.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15217, 2017.

ZANIN, A. R. A. *et al.* Reduction of pesticide application via real-time precision spraying. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 5638, 2022.

ZAVODSKA, R.; SEHADOVA, H. The rate of DNA synthesis in ovaries, fat body cells, and pericardial cells of the bumblebee (*Bombus terrestris*) depends on the stage of ovarian maturation. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1034584, 2023.

APÊNDICES

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6	CTR vs. 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	31.10	No	ns	0.3432
7	CTR vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	122.5	Yes	****	<0.0001
8	CTR vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	186.8	Yes	****	<0.0001
9	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	91.43	Yes	****	<0.0001
10	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	155.7	Yes	****	<0.0001
11	2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	64.26	Yes	***	0.0005
12					
13	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1
14	CTR vs. 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	285.6	254.5	31.10	100
15	CTR vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	285.6	163.1	122.5	100
16	CTR vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	285.6	98.82	186.8	100
17	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	254.5	163.1	91.43	100
18	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	254.5	98.82	155.7	100
19	2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	163.1	98.82	64.26	100

Apêndice A – Morfometria dos Trofócitos: Teste de comparações múltiplas de Dunn

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6	CTR vs. 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	44.59	Yes	*	0.0383
7	CTR vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	175.0	Yes	****	<0.0001
8	CTR vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	226.3	Yes	****	<0.0001
9	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	130.4	Yes	****	<0.0001
10	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	181.7	Yes	****	<0.0001
11	2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	51.33	Yes	*	0.0102
12					
13	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1
14	CTR vs. 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	312.0	267.4	44.59	100
15	CTR vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	312.0	137.0	175.0	100
16	CTR vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	312.0	85.67	226.3	100
17	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	267.4	137.0	130.4	100
18	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	267.4	85.67	181.7	100
19	2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	137.0	85.67	51.33	100

Apêndice B – Morfometria dos Enócitos: Teste de comparações múltiplas de Dunn

Kruskal-Wallis test Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6	CTR vs. 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-180.2	Yes	****	<0.0001
7	CTR vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-193.0	Yes	****	<0.0001
8	CTR vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-180.8	Yes	****	<0.0001
9	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-12.79	No	ns	>0.9999
10	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-0.5200	No	ns	>0.9999
11	2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	12.27	No	ns	>0.9999
12					
13	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1
14	CTR vs. 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	74.72	255.0	-180.2	100
15	CTR vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	74.72	267.8	-193.0	100
16	CTR vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	74.72	255.5	-180.8	100
17	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	255.0	267.8	-12.79	100
18	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	255.0	255.5	-0.5200	100
19	2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	267.8	255.5	12.27	134

Apêndice C – Morfometria das Células Pericárdicas: Teste de comparações múltiplas de Dunn

Ordinary one-way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.001			
4					
5	Holm-Sidak's multiple comparisons test	Mean Diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6	CTR vs. 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-13.64	Yes	***	0.0002
7	CTR vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-194.2	Yes	****	<0.0001
8	CTR vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-199.3	Yes	****	<0.0001
9	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-180.5	Yes	****	<0.0001
10	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-185.6	Yes	****	<0.0001
11	2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	-5.091	No	ns	0.1194
12					
13	Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.
14	CTR vs. 1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	26.73	40.36	-13.64	3.199
15	CTR vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	26.73	220.9	-194.2	3.199
16	CTR vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	26.73	226.0	-199.3	3.199
17	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	40.36	220.9	-180.5	3.199
18	1,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	40.36	226.0	-185.6	3.199
19	2,5 $\mu\text{L L}^{-1}$ vs. 3,5 $\mu\text{L L}^{-1}$	220.9	226.0	-5.091	3.199

Apêndice D – Ensaio Cometa: Teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak