

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências e Tecnologias para a Sustentabilidade  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

**Kyl Assaf**

**Caracterização morfológica do cérebro e do intestino médio das abelhas *Xylocopa*  
*suspecta* e *Xylocopa frontalis***

Sorocaba

2025

**Kyl Assaf**

**Caracterização morfológica do cérebro e do intestino médio das abelhas *Xylocopa suspecta* e *Xylocopa frontalis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Cristina Mathias da Silva

Financiamento: CAPES

Sorocaba

2025

Assaf, Kyl

Caracterização morfológica do cérebro e do intestino médio das abelhas *Xylocopa suspecta* e *Xylocopa frontalis* / Kyl Assaf -- 2025.  
107f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Elaine Cristina Mathias da Silva

Banca Examinadora: Fabio Camargo Abdalla, Elton Luiz Scudeler, Daniela Carvalho dos Santos, Cristiane Ronchi de Oliveira

Bibliografia

1. Ciências Biológicas. 2. Morfologia. I. Assaf, Kyl. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

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



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Kyl Assaf, realizada em 18/06/2025.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva (UFSCar)



Documento assinado digitalmente

**ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA**

Data: 18/06/2025 19:34:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Elton Luiz Scudeler (UNESP)



Documento assinado digitalmente

**ELTON LUIZ SCUDELER**

Data: 23/06/2025 09:12:31-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos (UNESP)



Documento assinado digitalmente

**DANIELA CARVALHO DOS SANTOS**

Data: 23/06/2025 15:03:37-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fabio Camargo Abdalla (UFSCar)



Documento assinado digitalmente

**FABIO CAMARGO ABDALLA**

Data: 23/06/2025 15:33:36-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Cristiane Ronchi de Oliveira (UNIANCHIETA)



Documento assinado digitalmente

**CRISTIANE RONCHI DE OLIVEIRA**

Data: 23/06/2025 12:26:28-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elaine Cristina Mathias da Silva por ter aceito me orientar, pois eu não tinha experiência alguma com abelhas, mas, ainda assim, confiou que eu pudesse realizar este importante trabalho. Sou muito grata, também, pela sua gentileza frente aos desafios que enfrentamos. Aprendi muito com seu jeito de encarar as situações adversas, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal.

Sou muito grata a todos os alunos que estiveram comigo no Núcleo de Pesquisa em Ecotoxicologia e Conservação de abelhas, pelo companheirismo e amizade. Gostaria de agradecer especialmente à Pâmela Decio e à Rafaela Tadei, pois me ajudaram muito durante o período de afastamento da Prof<sup>ª</sup>. Elaine.

Agradeço à Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Inês da Silva por se disponibilizar a nos ajudar com as abelhas estudadas nesta tese, dividindo seu conhecimento sobre a bionomia desses importantes polinizadores, além da identificação dos grãos de pólen. Foi uma ajuda essencial.

Agradeço ao Aduino Rizzi por ter nos levado aos pontos de instalação dos ninhos artificiais na cidade de Itu, assim como aos proprietários dos locais onde os ninhos foram instalados.

Agradeço à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Leticia Souto pela colaboração com o uso dos equipamentos do Laboratório de Diversidade Vegetal.

Agradeço aos profissionais da UNESP, *campus* Botucatu, pela ajuda durante o uso do microscópio eletrônico.

Agradeço à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Moema Hausen pela ajuda com os experimentos de viabilidade celular e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Eliana Duek por disponibilizar insumos para a realização desses experimentos.

Agradeço aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental (PPGBMA) pelos conhecimentos passados durante as disciplinas.

Agradeço aos demais funcionários da UFSCar-So por todos os serviços prestados durante o desenvolvimento desta tese.

Agradeço aos colegas pós-graduandos do PPGBMA pelo companheirismo e troca de conhecimentos, especialmente à Michele Provase.

Agradeço à CAPES pelo financiamento.

Por fim, agradeço aos meus familiares e amigos que me acompanharam e me apoiaram durante a realização desta tese.

## RESUMO

ASSAF, Kyl. **Caracterização morfológica do cérebro e do intestino médio das abelhas *Xylocopa suspecta* e *Xylocopa frontalis***. 2025. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba.

As abelhas não sociais são importantes polinizadores da vegetação natural e cultivada, como as abelhas do gênero *Xylocopa*, consideradas parassociais, as quais são essenciais na polinização de flores grandes, como as do maracujazeiro amarelo, ou flores com anteras porcidas, como as do tomate. Contudo, a presença dessas abelhas nos cultivos agrícolas as expõe a agrotóxicos. Sendo assim, a fim de ampliar o conhecimento sobre as espécies nativas brasileiras não sociais, o objetivo desta tese foi utilizar abelhas das espécies *Xylocopa frontalis* e *Xylocopa suspecta* para análises morfológicas do cérebro e do intestino médio. Para isso, foram realizadas a caracterização histológica das principais estruturas cerebrais das espécies *X. frontalis* e *X. suspecta* e a estimativa do volume das neurópilas dos corpos pedunculados das abelhas *X. frontalis*. As estruturas estudadas (corpos pedunculados, lobos ópticos e lobos antenais) mostraram-se semelhantes àquelas já relatadas para outras espécies de abelhas sociais, com exceção dos volumes das neurópilas dos corpos pedunculados que foram maiores em relação àqueles relatados pra abelhas de grande porte. A caracterização do intestino médio de ambas as espécies de abelhas revelou que os tipos celulares são similares aqueles observados em outras abelhas e outros organismos da classe Insecta, porém, a organização celular é peculiar, sendo este o primeiro relato sobre esta morfologia.

Palavras-chave: sistema nervoso; sistema digestório; abelhas carpinteiras, abelhas parassociais.

## ABSTRACT

Non-social bees are important pollinators of natural and cultivated vegetation, such as the parasocial bees of the genus *Xylocopa*, which are essential for pollinating large flowers, such as yellow passion fruit, or flowers with poricidal anthers, such as tomatoes. However, the presence of these bees in agricultural crops exposes them to pesticides. Therefore, to expand knowledge about non-social native Brazilian species, the objective of this thesis was to use bees *Xylocopa frontalis* and *Xylocopa suspecta* for morphological analyses of the brain and midgut. To this end, histological characterization of the main brain structures of the species *X. frontalis* and *X. suspecta* and estimation of the volume of the neuropils of the pedunculate bodies of *X. frontalis* bees were performed. The structures studied (mushroom bodies, optic lobes, and antennal lobes) were similar to those previously reported for other social bee species, except that the neuropil volumes of the mushroom bodies were larger than those reported for large bees. Characterization of the midguts of both bee species revealed that the cell types are similar to those observed in other bees and other organisms of the class Insecta; however, the cellular organization is unique, and this is the first report of this morphology.

Keywords: nervous system; digestive system; carpenter bees, parasocial bees.

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1 .....	9
1.1	INTRODUÇÃO GERAL .....	9
1.1.1	Objetivos.....	10
1.2	REVISÃO DE LITERATURA .....	11
1.2.1	Características Gerais das Abelhas do Gênero <i>Xylocopa</i> .....	11
1.2.2	Plantas Visitadas por Espécies de <i>Xylocopa</i> .....	12
1.2.3	Estudos com <i>Xylocopa</i> spp.....	14
	REFERÊNCIAS .....	16
2	CAPÍTULO 2 .....	19
2.1	INTRODUÇÃO.....	21
2.2	METODOLOGIA.....	22
2.2.1	Coleta e Transporte de Abelhas ao Laboratório .....	22
2.2.2	Dissecação do Cérebro .....	23
2.2.3	Processamento Histológico e Microtomia.....	23
2.2.4	Análise Morfológica do Cérebro .....	23
2.2.5	Estimativa do Volume das Neurópilas .....	24
2.3	RESULTADOS .....	25
2.3.1	Descrição das Principais Estruturas do Cérebro.....	25
2.3.2	Volume das Neurópilas .....	29
2.4	DISCUSSÃO .....	30
2.5	CONCLUSÕES.....	31
	REFERÊNCIAS .....	33
3	CAPÍTULO 3 .....	36
3.1	INTRODUÇÃO.....	39
3.2	METODOLOGIA.....	44
3.2.1	Coleta e Transferências das Abelhas para o Laboratório .....	44

3.2.2 Dissecção do Intestino Médio.....	44
3.2.3 Processamento Histológico e Microtomia.....	45
3.2.4 Caracterização Histológica.....	46
3.2.5 Caracterização Histoquímica.....	47
3.2.6 Caracterização Ultraestrutural.....	47
3.2.7 Plantas Utilizadas na Alimentação das Abelhas.....	47
3.3 RESULTADOS.....	48
3.3.1 Caracterização Histológica.....	48
3.3.2 Caracterização histoquímica.....	54
3.3.3 Caracterização Ultraestrutural.....	58
3.3.4 Plantas Utilizadas na Alimentação das Abelhas.....	68
3.4 DISCUSSÃO.....	71
3.5 CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS.....	80
4 CAPÍTULO 4.....	89
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
APÊNDICE – A.....	90
APÊNDICE – B.....	93
APÊNDICE – C.....	101
ANEXO – A.....	106

# 1 CAPÍTULO 1

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas do gênero *Xylocopa* (família Apidae, subfamília Xylocopinae, tribo Xylocopini), popularmente conhecidas como mamangavas de toco ou abelhas carpinteiras, são organismos não sociais que podem ocorrer em todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta, somando-se em mais de 700 espécies (Silveira *et al.*, 2002; Michener, 2007). No Brasil, há cerca de 50 espécies deste gênero, o qual está bem representado no Estado de São Paulo, onde já foram registradas 22 espécies, sendo *X. frontalis*, *X. brasilianorum*, *X. suspecta* e *X. artifex* as mais frequentes (Marchi e Alves-Dos-Santos, 2013).

As *Xylocopa* spp. podem possuir porte médio ou grande, o que as torna polinizadores essenciais de flores grandes, como as do maracujazeiro amarelo que não se autopolinizam (Siqueira *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014; Witter *et al.*, 2014; Yamamoto *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2017). Ainda, essas abelhas são importantes para flores com anteras poricidas, presentes nas flores de tomate, berinjela, pimentão entre outras, pois são capazes de promover a extração do pólen por meio de um processo denominado polinização por vibração (Witter *et al.*, 2014).

Sendo polinizadores de diversas plantas de interesse econômico, as abelhas do gênero *Xylocopa*, ficam vulneráveis em áreas agrícolas de manejo convencional, pois podem ser contaminadas pelos agrotóxicos quando em contato com a nuvem gerada durante a pulverização do produto, ou com superfícies das plantas atingidas pela sua deposição, como folhas (Bonmatin *et al.*, 2015; Cham *et al.*, 2020). Ainda, as abelhas podem ser expostas por meio do consumo de néctar e pólen contaminados pela deposição do produto pulverizado ou pela sua translocação quando aplicado em sementes, tronco ou solo (Bonmatin *et al.*, 2015; Cham *et al.*, 2020).

A avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas, no Brasil e em muitos outros países, tem como organismo modelo a abelha *Apis mellifera*, já que é a espécie mais utilizada nos cultivos agrícolas (apicultura migratória para polinização) e de importância econômica, devido à comercialização de produtos apícolas (Wolowski *et al.*, 2019); bem como tem sua biologia bem estudada (Cruz-Landim, 2009). Contudo, a sensibilidade aos agrotóxicos é diferente entre as espécies de abelhas, sendo tal fato relacionado a características como tamanho, massa corporal, grau de socialidade entre outros (Arena e Sgolastra, 2014; Lourencetti *et al.*, 2023; Sampson *et al.*, 2023). Além disso, o nível de exposição das abelhas aos

agrotóxicos pode variar, dependendo do local de nidificação, dos materiais utilizados na construção dos ninhos, do alcance de forrageamento, do nível de consumo de pólen e néctar e de outros aspectos de sua história natural (Heard *et al.*, 2017; Sgolastra *et al.*, 2019).

Por haver incertezas quanto à abelha *A. mellifera* ser o melhor organismo modelo para proteger as espécies nativas brasileiras, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) selecionou, dentre as abelhas nativas de relevância para os principais cultivos agrícolas do Brasil, potenciais espécies-modelos para análises de risco de agrotóxicos no país. Das abelhas não sociais, a espécie *X. frontalis* foi a mais indicada, pois tem ampla distribuição geográfica, ocorrência média nas culturas agrícolas e é uma espécie manejada, apesar de ainda não ser criada em larga escala para atender a demanda de testes toxicológicos (Pires e Torezani, 2018).

A exposição das abelhas do gênero *Xylocopa* a um agrotóxico não foi realizada nesta tese, pois não foi possível coletar indivíduos imaturos (apêndice A). Além disso, as fêmeas adultas coletadas durante forrageio nas flores não aceitaram o xarope oferecido, não sobrevivendo por mais de 1 dia em laboratório (apêndice B). No entanto, fragmentos do intestino médio de *X. frontalis* foram utilizados para teste de viabilidade celular após exposição ao inseticida imidacloprido (apêndice C), sendo que essa metodologia inovadora precisa ser aperfeiçoada para aquisição de dados mais robustos que fomentem diagnóstico de morte celular *in vitro* em microtecidos, o que reduz o número de indivíduos utilizados.

Sendo assim, a fim de ampliar o conhecimento sobre as espécies de abelhas *Xylocopa suspecta* (Moure & Camargo, 1988) e *Xylocopa frontalis* (Olivier, 1789), foram realizadas análises morfológicas do cérebro e do intestino médio dessas abelhas. Os resultados obtidos contribuirão para a padronização de futuras análises histopatológicas dos órgãos de abelhas não sociais expostas a agrotóxicos em bioensaios ecotoxicológicos, os quais poderão ser importantes para avaliações de risco de agrotóxicos para abelhas nativas que forrageiam em agroecossistemas brasileiros.

### 1.1.1 Objetivos

#### 1.1.2 Objetivo Geral

Caracterizar a morfologia do cérebro e do intestino médio das abelhas das espécies *Xylocopa frontalis* e *Xylocopa suspecta*.

### 1.1.3 Objetivos Específicos

- Descrever a estrutura do cérebro das abelhas das espécies *X. frontalis* e *X. suspecta*, por meio da análise histológica;
- Estimar o volume das neurópilas dos corpos pedunculados do cérebro das abelhas da espécie *X. frontalis*;
- Descrever a estrutura do intestino médio das abelhas das espécies *X. frontalis* e *X. suspecta*, por meio da análise histológica;
- Caracterizar, por meio da histoquímica, a porção mediana do epitélio do intestino médio das abelhas *X. frontalis* e *X. suspecta*;
- Descrever a ultraestrutura da porção mediana do intestino médio das abelhas *X. frontalis* e *X. suspecta* por meio da microscopia eletrônica de transmissão;
- Identificar os grãos de pólen das plantas, em nível de família, espécie e gênero, presentes no lúmen da porção mediana do intestino médio das abelhas *X. frontalis* e *X. suspecta*.

## 1.2 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1 Características Gerais das Abelhas do Gênero *Xylocopa*

As abelhas do gênero *Xylocopa* são conhecidas popularmente como mamangavas de toco ou abelhas carpinteiras por construírem ninhos em material vegetal, como madeira morta, colmos de bambus ou hastes de flores (Gerling *et al.*, 1989; Michener, 2007; Freitas *et al.*, 2017).

A nidificação realizada pelas *Xylocopa* spp. ocorre de forma solitária, ou seja, uma única fêmea seleciona um local e escava o substrato com suas mandíbulas; faz numerosos voos para coletar pólen e néctar e mistura-os até formar uma massa, a qual é depositada no fundo da célula; oviposita na massa de pólen e fecha a célula de cria, utilizando a serragem advinda da escavação, prosseguindo para a construção de outras, podendo construir de duas a cinco células (Marchi e Melo, 2010; Pereira e Garófalo, 2010; Silva *et al.*, 2014). O período de desenvolvimento larval é de 45 a 65 dias (Pereira e Garófalo, 2010; Silva *et al.*, 2014).

As espécies *X. frontalis* e *X. suspecta* têm um nível baixo de socialidade, sendo consideradas parassociais, pois os machos e as fêmeas recém-emergidos permanecem nos ninhos por cerca de 30 dias e são alimentados com néctar pela mãe (Camillo *et al.*, 1986; Marchi e Melo, 2010). Ainda, pode haver divisão de trabalho entre fêmeas dominantes, as quais ovipositam e forrageiam, e fêmeas que não estão mais na fase reprodutiva ou que ainda não a

alcançaram, sendo as responsáveis pela guarda do ninho (Marchi e Melo, 2010; Pereira e Garófalo, 2010; Freitas *et al.*, 2017). Porém, essas castas são consideradas estágios ontogênicos e não classes de indivíduos, pois a abelha guarda representa um estágio inativo de seu ciclo reprodutivo (Hogendoorn e Velthuis, 1995).

Para a defesa do ninho, a abelha faz a ejeção de fezes nos intrusos, incluindo coespecíficos, quando se aproximam do ninho (Marchi e Melo, 2010). Ainda, as fezes podem oferecer informações relevantes sobre a atividade do ninho e seu número de ocupantes (Freitas *et al.*, 2017).

O número de gerações por ano das *Xylocopa* spp. é limitado pela temperatura e pela disponibilidade de alimento, sendo os climas quentes os mais favoráveis à reprodução delas (Gerling *et al.*, 1989). Um estudo que acompanhou as atividades de *X. frontalis* em Morretes (Paraná, Brasil) – região com clima subtropical – relatou que essa espécie é univoltina, tendo nidificado apenas nos meses mais quentes (Marchi e Melo, 2010). Porém, no cerrado, onde o clima é tropical, as abelhas *X. frontalis*, *X. suspecta*, *X. grisescens* e *X. hirsutissima* foram vistas nidificando o ano todo (Silva, 2009).

Essas abelhas podem possuir porte médio ou grande, como é o caso da espécie *X. frontalis*, a qual tem cerca de 30 a 36 mm, e da espécie *X. suspecta*, possuindo por volta de 23 mm (Gerling *et al.*, 1989; Marchi e Alves-dos-Santos, 2013). Outra característica das abelhas deste gênero é o forte dimorfismo sexual, tendo as fêmeas o integumento preto, às vezes com faixas ferrugíneas no metassoma, e os machos coloração predominantemente amarela ou laranja (Silveira *et al.*, 2002; Marchi e Alves-dos-Santos, 2013).

### 1.2.2 Plantas Visitadas por Espécies de *Xylocopa*

As abelhas do gênero *Xylocopa* são consideradas poliléticas, pois utilizam diversas espécies de plantas para a coleta de pólen e néctar (Bernardino e Gaglianone, 2008; Silva, 2009; Chaves Ferreira *et al.*, 2023).

As *Xylocopa* spp., devido ao seu tamanho avantajado, são eficientes polinizadores de flores grandes, como as do maracujá amarelo, da castanha do brasil, do urucum, do gergelim entre outras (Siqueira *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2017). Durante a coleta de pólen e néctar, o tórax da abelha entra em contato com as anteras e estigmas das flores, promovendo a polinização, o que não ocorre com abelhas de menor porte, como a espécie *Apis mellifera*, as quais realizam a coleta dos recursos florais sem tocar os órgãos reprodutores, atuando como ladras (Silva *et al.*, 2014, Witter *et al.*, 2014).

A maioria das espécies do gênero *Xylocopa* também têm uma associação importante com plantas que possuem anteras poricidas – isto é, estruturas tubulares com duas ou três aberturas nas extremidades – pois são capazes de polinizá-las por meio de um mecanismo denominado vibração, sonicação ou *buzz-pollination*, presentes nas flores de tomate, berinjela, pimentão entre outras (Buchmann, 1983; Switzer *et al.*, 2016). Esse mecanismo ocorre, normalmente, com a fêmea mordendo a antera ou a corola com suas mandíbulas e contraindo os músculos de voo indiretos, liberando o pólen de dentro das anteras (Russel *et al.*, 2016; Switzer *et al.*, 2016).

Em fragmentos do cerrado, localizados no Triângulo Mineiro, foram feitas observações de espécies de *Xylocopa* nas flores. Dentre as abelhas, as espécies observadas foram *X. suspecta*, *X. frontalis*, *X. grisescens* e *X. hirsutissima*, as quais foram vistas coletando pólen de *Erytheca* spp., *Kielmeyera* spp., *Senna* spp., *Solanum* spp. dentre outras; e néctar de *Crotalaria* spp., *Amphilophium elongatum*, *Handroanthus ochraceus*, *Qualea* spp., *Vochysya* spp. dentre outras (Silva, 2009).

Em área de restinga, localizada no Rio de Janeiro, a espécie *X. ordinaria* foi observada coletando pólen de *Solanum curvispinum*, *Clusia hilariana*, *Allagoptera arenaria* e *Byrsonima sericea*. Para a coleta de néctar, *X. ordinaria* visitou principalmente *Arrabidaea conjugata*, *Mandevilla funiformis*, *Manilkara subsericea*, *Passiflora alliacea* e *Centrosema brasilianum* (Bernardino e Gaglianone, 2008).

No Estado do Maranhão, onde há a convergência da vegetação úmida da floresta ombrófila com a vegetação seca e aberta do cerrado, foram identificados três subgêneros e 12 espécies de *Xylocopa* encontradas visitando diversas espécies de plantas, das quais as famílias mais representativas foram Fabaceae, Malvaceae, Asteraceae e Convolvulaceae, sendo a maioria plantas nativas. Ainda, plantas nectaríferas foram mais visitadas em comparação às poliníferas (Chaves Ferreira *et al.*, 2023).

Em um estudo no qual foram determinadas as principais espécies de abelhas para a polinização de diversos cultivos no Brasil, o gênero *Xylocopa* destacou-se, possuindo 12 espécies importantes para 10 tipos de plantações, as quais oferecem serviços de polinização com um valor anual estimado em \$1.617 milhões de dólares (Giannini *et al.*, 2020). Dentre as espécies importantes, *X. frontalis* foi registrada interagindo com 7 cultivos, sendo eles o de tomate, de maracujá, de goiaba, de feijão, de castanha do brasil, de urucum e de umbu (Giannini *et al.*, 2020).

### 1.2.3 Estudos com *Xylocopa* spp.

Estudos sobre as abelhas do gênero *Xylocopa* foram procurados na base de dados PubMed. Para isso, foram pesquisadas as respectivas palavras-chave em títulos e resumos de artigos: *Xylocopa* OR “carpenter bee”; *Xylocopa* AND brain; *Xylocopa* AND “nervous system”; “carpenter bee” AND brain; “carpenter bee” AND “nervous system”; *Xylocopa* AND gut; *Xylocopa* AND midgut; “carpenter bee” AND gut; “carpenter bee” AND midgut. Os resultados são mostrados na tabela 1.

Tabela 1 – Palavras-chave utilizadas para a busca de artigos sobre *Xylocopa* e seus órgãos.

Palavras-chave	Resultados	Período
<i>Xylocopa</i> OR "carpenter bee"	197	1977 a 2025
<i>Xylocopa</i> AND brain	2	2013 a 2025
<i>Xylocopa</i> AND "nervous system"	0	
"carpenter bee" AND brain	9	2013 a 2025
"carpenter bee" AND "nervous system"	0	
<i>Xylocopa</i> AND gut	7	2018 a 2025
<i>Xylocopa</i> AND midgut	2	2020 a 2025
"carpenter bee" AND gut	3	2016 a 2025
"carpenter bee" AND midgut	0	

Fonte: autoria própria.

A pesquisa com as palavras-chave *Xylocopa* OR “carpenter bee” retornou 197 resultados, compreendendo o período entre 1977 e 2025 (figura 1).

Na busca por *Xylocopa* AND brain, foram encontrados dois artigos, publicados nos anos de 2013 e 2025, os quais apresentam dados sobre a fisiologia do cérebro de uma espécie

encontrada no Japão, a *Xylocopa appendiculata*. Para as palavras-chave *Xylocopa* AND “nervous system” não houve resultado.

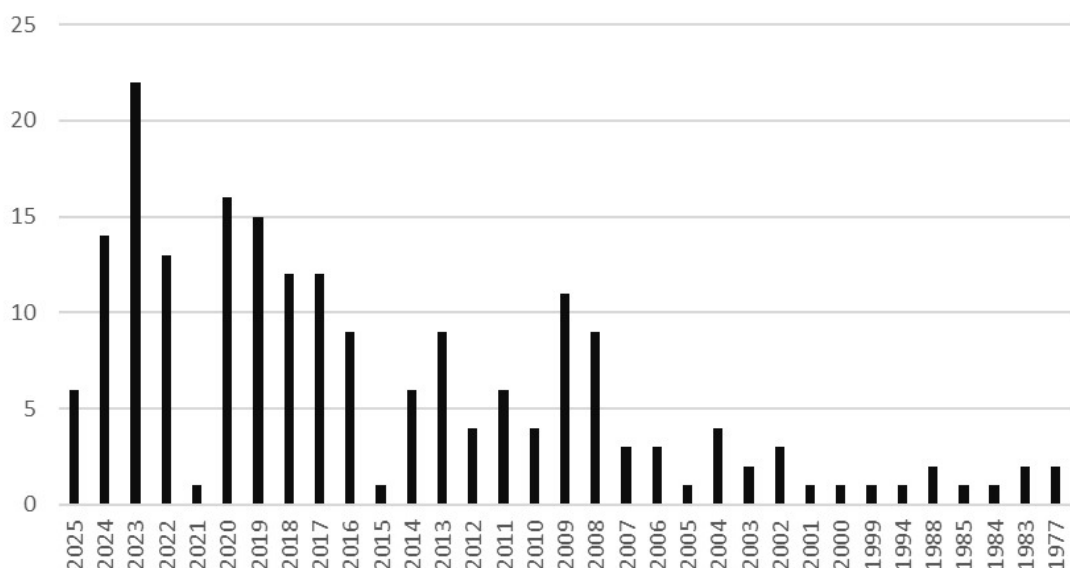
As palavras-chave “carpenter bee” AND brain resultaram em 9 artigos publicados de 2013 a 2025. A maioria dos artigos é da área da genética e utiliza abelhas do gênero *Ceratina*. Essas abelhas pertencem à subfamília Xylocopinae, sendo igualmente denominadas abelhas carpinteiras, porém, possuem porte pequeno. Apenas um artigo teve como objetivo avaliar o efeito da experiência de forrageamento e do comportamento social no volume dos corpos pedunculados das abelhas desse gênero. As palavras-chave “carpenter bee” AND “nervous system” não retornaram resultados.

*Xylocopa* AND gut resultaram em sete artigos publicados de 2018 a 2025, sendo todos sobre o microbioma de diversas espécies desse gênero. *Xylocopa* AND midgut resultaram em dois artigos, de 2020 e de 2025, ambos sobre o microbioma de espécies encontradas em países asiáticos.

As palavras-chave “carpenter bee” AND gut retornaram 3 artigos, de 2016, 2018 e 2025. Dois artigos são sobre o microbioma de *Xylocopa* spp. e um sobre as bactérias presentes no pólen de *Ceratina calcarata*.

Sendo assim, a morfologia do cérebro e do intestino médio ainda não foi relatada, o que torna necessário o desenvolvimento de estudos nessa área com as espécies do gênero *Xylocopa*, especialmente na região neotropical.

Figura 1 – Número de artigos publicados na base de dados PubMed, contendo no título e no resumo as palavras-chave *Xylocopa* OR “carpenter bee”.



Fonte: autoria própria.

## REFERÊNCIAS

- ARENA, M.; SGOLASTRA, F. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 324-334, 2014.
- BERNARDINO, A. S.; GAGLIANONE, M. C. Nest distribution and nesting habits of *Xylocopa ordinaria* Smith (Hymenoptera, Apidae) in a restinga area in the northern Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 3, p. 434-440, 2008.
- BONMATIN, J. M.; GIORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C.; LIESS, M.; LONG, E.; MARZARO, M.; MITCHELL, E. A. D.; NOOME, D. A.; SIMON-DELISO, N.; TAPPARO, A. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environ Sci. Pollut. Res.**, v. 22, p. 35-67, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>. Acesso em: 20/10/2023.
- BUCHMANN, S. L. Buzz pollination in angiosperms. In: JONES, C. E.; LITTLE, R. J. (ed.) **Handbook of experimental pollination biology**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1983.
- CAMILLO, E.; GARÓFALO, C. A.; MUCCILLO, G. On the Bionomics of *Xylocopa Suspecta* (Moure) in Southern Brazil: Nest Construction and Biological Cycle (Hymenoptera, Anthophoridae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 46, n. 2, p. 383-393, 1986.
- CHAM, K. O.; REBELO, R. M.; OLIVEIRA, R. P.; FERRO, A. A.; VIANA-SILVA, F. E. C. V.; BORGES, L. O.; SARETTO, C. O. S. D.; TONELLI, C. A. M.; MACEDO, T. C. **Manual de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas**. Brasília: Ibama/Diqua, 2020. Disponível em: [https://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/2020-12-10-Mamual\\_ARA\\_Abelhas\\_2ed-Ibama.pdf](https://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/2020-12-10-Mamual_ARA_Abelhas_2ed-Ibama.pdf). Acesso em: 18/04/2022.
- CHAVES FERREIRA, L. A.; GIANNINI, T. C.; ZANELLA, F. C. V.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Floral preferences of carpenter bees (Apidae: Xylocopini: *Xylocopa*) from Maranhão, Northeast Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 59, n. 3, p. 772-786, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01650521.2023.2265630>. Acesso em: 20/06/2024.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009.
- FREITAS, B. M.; SILVA, C. I.; BEZERRA, A. D. M. **A história natural ilustrada de um polinizador: a abelha mamangava *Xylocopa frontalis***. São Paulo: A.B.E.L.H.A., 2017.
- GERLING, D.; VELTHUIS, H. H. W.; HEFETZ, A. Bionomics of the Large Carpenter Bees of the Genus *Xylocopa*. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 163-190, 1989.
- GIANNINI, T. C.; ALVES, D. A.; ALVES, R.; CORDEIRO, G. D.; CAMPBELL, A. J.; AWADE, M.; BENTO, J. M. S.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Unveiling the contribution of bee pollinators to Brazilian crops with implications for bee management. **Apidologie**, v. 51, p. 406-421, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00727-3>. Acesso em: 12/09/2021.

- HEARD, M. S.; BAAS, J.; DORNE, J. L.; LAHIVE, E.; ROBINSON, A. G.; RORTAIS, A.; SPURGEON, D. J.; SVENDSEN, C.; HESKETH, H. Comparative toxicity of pesticides and environmental contaminants in bees: are honey bees a useful proxy for wild bee species? **Science of the Total Environment**, v. 578, p. 357-365, 2017.
- HOGENDOORN, K.; VELTHUIS, H. H. W. The role of young guards in *Xylocopa pubescens*. **Insectes Sociaux**, v. 42, p. 427-448, 1995.
- LOURENCETTI, A. P. S.; AZEVEDO, P.; MIOTELO, L.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Surrogate species in pesticide risk assessments: toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, 120842, 2023.
- MARCHI, P.; ALVES-DOS-SANTOS, I. As abelhas do gênero *Xylocopa* Latreille (Xylocopini, Apidae) do Estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 13, n. 2, 2013
- MARCHI, P.; MELO, G. A. R. Biologia de nidificação de *Xylocopa (Neoxylocopa) frontalis* (Olivier) (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini) em Morretes, Paraná. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 210-231, 2010.
- MICHENER, C. D. **The bees of the World**. 2ª ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 2007.
- MOURE, J. S.; CAMARGO, J. M. F. Uma nova espécie de *Xylocopa (Neoxylocopa)* do Brasil (Hymenoptera: Apoidea). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 32, n. 2, p. 209-214, 1988.
- OLIVIER, G. A. Abeille. In: LATREILLE, P. A. (org.). **Encyclopédie Méthodique: Histoire Naturelle**. Insectes. 4 ed. Paris: Chez Panckoucke, 1789.
- PEREIRA, M.; GARÓFALO, C. A. Biologia da nidificação de *Xylocopa frontalis* e *Xylocopa grisescens* (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini) em ninhos-armadilha. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 193-209, 2010.
- PIRES, C. S. S.; TOREZANI, K. R. S. **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos**. Brasília: Ibama; 2018.
- RUSSELL, A. L.; LEONARD, A. S.; GILLETTE, H. D.; PAPA, D. R. Concealed floral rewards and the role of experience in floral sonication by bees. **Anim. Behav.**, v. 120, p. 83-91, 2016.
- SAMPSON, B.; GREGORC, A.; ALBURAKI, M.; WERLE, C.; KARIM, S.; ADAMCZYK, J.; KNIGHT, P. Sensitivity to imidacloprid insecticide varies among some social and solitary bee species of agricultural value. **PLoS ONE**, v. 18, n. 5, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285167>. Acesso em: 10/05/2024.
- SGOLASTRA, F.; HINAREJOS, S.; PITTS-SINGER, T. L.; BOYLE, N.K.; JOSEPH, T.; LÜCKMANN, J.; RAINE, N. E.; SINGH, R.; WILLIAMS, N. M.; BOSCH, J. Pesticide exposure assessment paradigm for solitary bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 22-35, 2019.

SILVA, C. I. **Distribuição espaço-temporal de recursos florais utilizados por *Xylocopa* spp. e interação com plantas de cerrado sentido restrito no Triângulo Mineiro**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

SILVA, C. I.; OLIVEIRA, P. E. A. M.; GARÓFALO, C. A. Manejo e conservação de polinizadores do maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). In: RIBEIRO, M. F. (ed.). **Terceira Semana dos Polinizadores: palestras e resumos**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2012.

SILVA, C. I.; MARCHI, P.; ALEIXO, K. P.; NUNES-SILVA, B.; FREITAS, B. M.; GARÓFALO, C. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; OLIVEIRA, P. E. A. M.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Manejo dos polinizadores e polinização de flores do maracujazeiro**. 1ª ed. São Paulo: Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, 2014.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fernando A. Silveira, 2002.

SIQUEIRA, K. M. M. DE; KIILL, L. H. P.; MARTINS, C. F.; LEMOS, I. B.; MONTEIRO, S. P.; FEITOZA, E. A. Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 1-12, 2009.

SWITZER, C. M.; HOGENDOORN, K.; RAVI, S.; COMBES, S. A. Shakers and head bangers: differences in sonication behavior between Australian *Amegilla murrayensis* (blue-banded bees) and North American *Bombus impatiens* (bumblebees). **Arthropod Plant Interact**, v. 10, p. 18, 2016.

WITTER, S.; NUNES-SILVA, P.; BLOCHTEIN, B.; LISBOA, B. B.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **As abelhas e a agricultura**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2014. Disponível em: <http://www.pucrs.br/edipucrs>. Acesso em: 20/01/2021.

WOLOWSKI, M.; AGOSTINI, K.; RECH, A. R.; VARASSIN, I. G.; MAUÉS, M.; FREITAS, L.; CARNEIRO, L. T.; BUENO, R. O.; CONSOLARO, H.; CARVALHEIRO, L.; SARAIVA, A. M.; SILVA, C. I. **Relatório temático sobre polinização, polinizadores e produção de alimentos no Brasil**. São Carlos: Editora Cubo, 2019. Disponível em: <https://doi.editoracubo.com.br/10.4322/978-85-60064-83-0>. Acesso em: 10/09/2023.

YAMAMOTO, M.; SILVA, C. I.; AUGUSTO, S. C.; BARBOSA, A. A. A.; OLIVEIRA, P. E. The role of bee diversity in pollination and fruit set of yellow passion fruit (*Passiflora edulis* forma *flavicarpa*, Passifloraceae) crop in Central Brazil. **Apidologie (Celle)**, v. 43, p. 51-62, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0120-6>. Acesso em: 20/08/2021.

## 2 CAPÍTULO 2

Caracterização do cérebro das abelhas *Xylocopa suspecta* e *Xylocopa frontalis*

Characterization of *Xylocopa suspecta* and *Xylocopa frontalis* brain

### Resumo

O cérebro das abelhas, assim como dos demais insetos, segue um padrão, sendo constituído pelo protocérebro, formado pelos lobos ópticos, corpos pedunculados, complexo central, ponte cerebral e *pars intercerebralis*; pelo deutocérebro, formado pelos lobos antenais; e tritocérebro, formado por dois pequenos lobos posteriores aos lobos antenais. Contudo, cérebros de abelhas não sociais ainda são pouco estudados em relação ao da espécie social *Apis mellifera*, o qual tem sido bem estudado para avaliações dos efeitos de inseticidas neurotóxicos. O entendimento inicial sobre a morfologia e anatomia cerebral das abelhas não sociais se faz necessário para a realização de futuros estudos ecotoxicológicos. Sendo assim, o objetivo desta tese foi caracterizar as principais estruturas dos cérebros das abelhas parassociais *Xylocopa frontalis* e *Xylocopa suspecta*, abelhas nativas que forrageiam em cultivos nos quais inseticidas neurotóxicos são aplicados. Para isso, foi realizada a caracterização morfológica do cérebro de ambas as espécies por meio de histologia e a estimativa do volume das neurópilas dos corpos pedunculados da espécie *Xylocopa frontalis*, aplicando-se o princípio de Cavalieri, um método estereológico. A histologia revelou que as estruturas presentes no cérebro de ambas espécies são semelhantes, sendo formado pelas mesmas estruturas descritas para as demais espécies de abelhas. A estimativa do volume das neurópilas dos corpos pedunculados das abelhas *Xylocopa frontalis*, por sua vez, mostrou que o volume é maior que aqueles relatados para abelhas de grande porte, como as do gênero *Bombus*. O estudo da morfologia cerebral dessas espécies poderá servir de base para investigações futuras sobre o efeito de inseticidas neurotóxicos em suas funções cerebrais.

Palavras-chave: sistema nervoso; corpos pedunculados; abelhas carpinteiras.

## Abstract

The bee brain, as well as other insects, follows a pattern, consisting of the protocerebrum, formed by the optic lobes, mushroom bodies, central complex, cerebral pons, and *pars intercerebralis*; the deutocerebrum, formed by the antennal lobes; and the tritocerebrum, formed by two small lobes posterior to the antennal lobes. However, brains of non-social bees are still poorly studied compared to those of the social species *Apis mellifera*, which has been extensively studied to assess the effects of neurotoxic insecticides. An initial understanding of the brain morphology and anatomy of non-social bees is necessary for future ecotoxicological studies. Therefore, the objective of this thesis was to characterize the main brain structures of the parasocial bees *Xylocopa frontalis* and *Xylocopa suspecta*, Brazilian native bees that forage on crops where neurotoxic insecticides are applied. To this end, morphological characterization of the brains of both species was performed through histology, and the mushroom bodies neuropils volume of *Xylocopa frontalis* was estimated, applying Cavalieri's principle, a stereological method. Histology revealed that the structures present in the brains of both species are similar, consisting of the same structures described for other bee species. The mushroom bodies neuropils volume estimation of *Xylocopa frontalis*, in turn, showed that the volume is larger than that reported for large bees, such as those of the genus *Bombus*. Studying the brain morphology of these species could serve as a basis for future investigations into the effect of neurotoxic insecticides on their brain functions.

Keywords: nervous system; mushroom bodies; carpenter bees.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de insetos, o cérebro exibe um padrão, tendo funções que se diferenciam de acordo com o estilo de vida, como o nível de socialidade, por exemplo (Bouchebti e Arganda, 2020).

Nas abelhas, o cérebro é formado por três partes: 1. protocérebro – sendo a área predominante – constituído pelos lobos ópticos (LO), corpos pedunculados (CP), complexo central (CC), ponte cerebral (PC) e *pars intercerebralis* (PI); 2. deutocérebro, constituído pelos lobos antenais (LA); e 3. tritocérebro, constituído por dois pequenos lobos posteriores aos LA (Cruz-Landim, 2009; Nocelli *et al.*, 2011, Rother *et al.*, 2021). Os neurônios que formam as estruturas cerebrais organizam-se de modo a delimitar duas regiões: a somata, onde localizam-se os corpos celulares, e a neurópila, contendo os prolongamentos celulares (Cruz-Landim, 2009; Nocelli *et al.*, 2011, Rother *et al.*, 2021). Ainda, o cérebro é envolto por uma camada escura acelular, a lamela neural esclerotizada, uma estrutura semelhante à cutícula do exoesqueleto, estando presente em todos os órgãos de origem ectodérmica (Cruz-Landim, 2009).

Os CP são estruturas que se assemelham a cogumelos, sendo por isso denominadas *mushroom bodies* em inglês. Os neurônios que os constituem, denominados células de Kenyon (CK), são pseudounipolares, ou seja, do soma parte um único prolongamento em direção à sua neurópila correspondente, onde ele irá se dividir em axônio e dendritos, sendo esta uma característica observada especialmente nos invertebrados (Bullock e Horridge, 1965).

Os dendritos das CK formam dois cálices, um médio e um lateral, os quais recebem estímulos vindos de diferentes partes do cérebro (Mobbs, 1982). A borda dos cálices, denominada lábios, recebe informações olfatórias vindas dos lobos antenais; a parede, chamada de colar, recebe informações visuais dos lobos ópticos; e o fundo, ou anel basal, recebe uma mistura de ambas as informações (Mobbs, 1982).

Os corpos celulares das CK localizam-se no interior dos cálices e contornando os lábios, podendo ser classificadas como: compactas internas (CI), pois ocupam uma faixa central nos cálices, possuem somas relativamente menores e núcleos mais compactos; compactas externas (CE), pois possuem as mesmas características das anteriores, mas contornam as bordas dos cálices; não compactas (NC), pois são relativamente maiores que as outras células, estando presentes na periferia dos cálices (Cruz-Landim, 2009).

As células NC projetam seus dendritos para os lábios ou para o colar, podendo receber informações olfatórias ou visuais, respectivamente. Já os dendritos das CI formam o anel basal,

sendo responsáveis por receber ambas as informações (Strausfeld, 2002). Já as projeções dendríticas das CE estão presentes por todo o cálice (Strausfeld, 2002). Os axônios das CK partem da base de cada um dos cálices e convergem para formar um pedúnculo (Farris *et al.*, 2001). Esses prolongamentos, então, se bifurcam de modo que cada CK inerva dois lobos, o alfa e o beta, os quais fazem conexões com outros neurônios protocerebrais (Farris *et al.*, 2001).

Os lobos ópticos são formados por três massas de neurópila denominadas, de fora para dentro, lâmina, medula e lóbulo (Cruz-Landim, 2009; Nocelli *et al.*, 2011, Rother *et al.*, 2021). Entre elas, os axônios cruzam-se produzindo os quiasmas interno, sendo aquele entre o lóbulo e a medula, e o externo, entre a medula e a lâmina (Cruz-Landim, 2009; Nocelli *et al.*, 2011, Rother *et al.*, 2021).

Os lobos antenais são estruturas arredondadas constituídas por uma região central com uma neurópila menos densa envolta por vários glomérulos com uma neurópila mais compacta (Cruz-Landim, 2009; Nocelli *et al.*, 2011). Cada lobo está relacionado a uma antena e deles parte um nervo antenal, podendo conter tanto axônios motores, que inervam os músculos das antenas, quanto axônios sensoriais, que transmitem informações sensoriais vindas das antenas (Kloppenburger, 1995). Circundando os glomérulos, há interneurônios que retransmitem as informações para os corpos pedunculados, onde elas serão processadas (Mobbs, 1985).

O cérebro das abelhas da espécie *Apis mellifera* tem suas estruturas e funções bem estudadas, principalmente em estudos ecotoxicológicos, os quais têm sido desenvolvidos para analisar os efeitos subletais de inseticidas neurotóxicos no cérebro dessas abelhas (Blacquièrre *et al.*, 2012; Heard *et al.*, 2017).

Portanto, o entendimento inicial sobre a morfologia e anatomia das abelhas não sociais se faz necessário para a realização de futuros estudos ecotoxicológicos. Sendo assim, o objetivo desta tese foi caracterizar as principais estruturas dos cérebros das abelhas parassociais *Xylocopa frontalis* e *Xylocopa suspecta*, abelhas nativas que forrageiam em cultivos de interesse econômico. Os resultados oferecerão uma base para estudos ecotoxicológicos sobre os efeitos subletais de inseticidas neurotóxicos neste órgão-alvo.

## 2.2 METODOLOGIA

### 2.2.1 Coleta e Transporte de Abelhas ao Laboratório

Fêmeas adultas das espécies *X. suspecta* (n = 4) e *X. frontalis* (n = 9) foram coletadas na propriedade privada Sítio São João (23°35'16.786" S, 47°31'37.302" W), na cidade de

Sorocaba, São Paulo, onde as plantas são cultivadas em um sistema agroflorestal, sem adição de agrotóxicos.

As abelhas foram acondicionadas em potes de plástico redondos de 1 L com perfurações para entrada de ar e transportadas para o Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental na Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba.

No laboratório, os potes contendo as abelhas permaneceram na estufa de incubação do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) em condições controladas de temperatura e umidade ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 10\%$  respectivamente, no escuro), por cerca de 1 hora antes do início dos experimentos.

### **2.2.2 Dissecção do Cérebro**

Após crioanestesia ( $\pm 14^{\circ}\text{C}$ , 15 minutos), cada uma das abelhas coletadas teve sua cabeça separado do resto do corpo (figura 1 – A e B). Sob estereomicroscópio (Leica EZ4HD), o cérebro foi dissecado com uma microtesoura e uma pinça, e banhado com solução salina tamponada com fosfato (PBS - 0,1 M, pH 7,2-7,4) durante esse processo. Após a dissecção, o cérebro foi transferido para uma solução fixadora (paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M, pH 7,2-7,4), na qual permaneceram por 24 horas sob refrigeração.

### **2.2.3 Processamento Histológico e Microtomia**

Os cérebros fixados foram lavados com tampão PBS (0,1 M, pH 7,2-7,4), gradualmente desidratados em etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%) para evitar retração tecidual e embebidos em resina histológica (Historesin Embedding Kit, Leica). Após a polimerização, os blocos contendo as amostras foram seccionados transversalmente a  $3\ \mu\text{m}$  de espessura, utilizando-se um micrótomo (Leica RM2255). As secções foram coletadas sequencialmente, utilizando-se lâminas para microscopia, as quais foram numeradas. Em cada uma das lâminas foram colocadas 3 secções.

As lâminas contendo as secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise morfológica do cérebro das abelhas e estimativa do volume das neurópilas (figura 1 – C).

### **2.2.4 Análise Morfológica do Cérebro**

Para a descrição das principais estruturas do cérebro das abelhas das espécies *X. suspecta* (n = 4) e *X. frontalis* (n = 9), as lâminas contendo secções com as regiões de interesse

(corpos pedunculados, lobos antenais e lobos ópticos) foram analisadas ao microscópio óptico de campo claro (Olympus SC30) e fotodocumentadas (Software Olympus cellSens Entry 1.14).

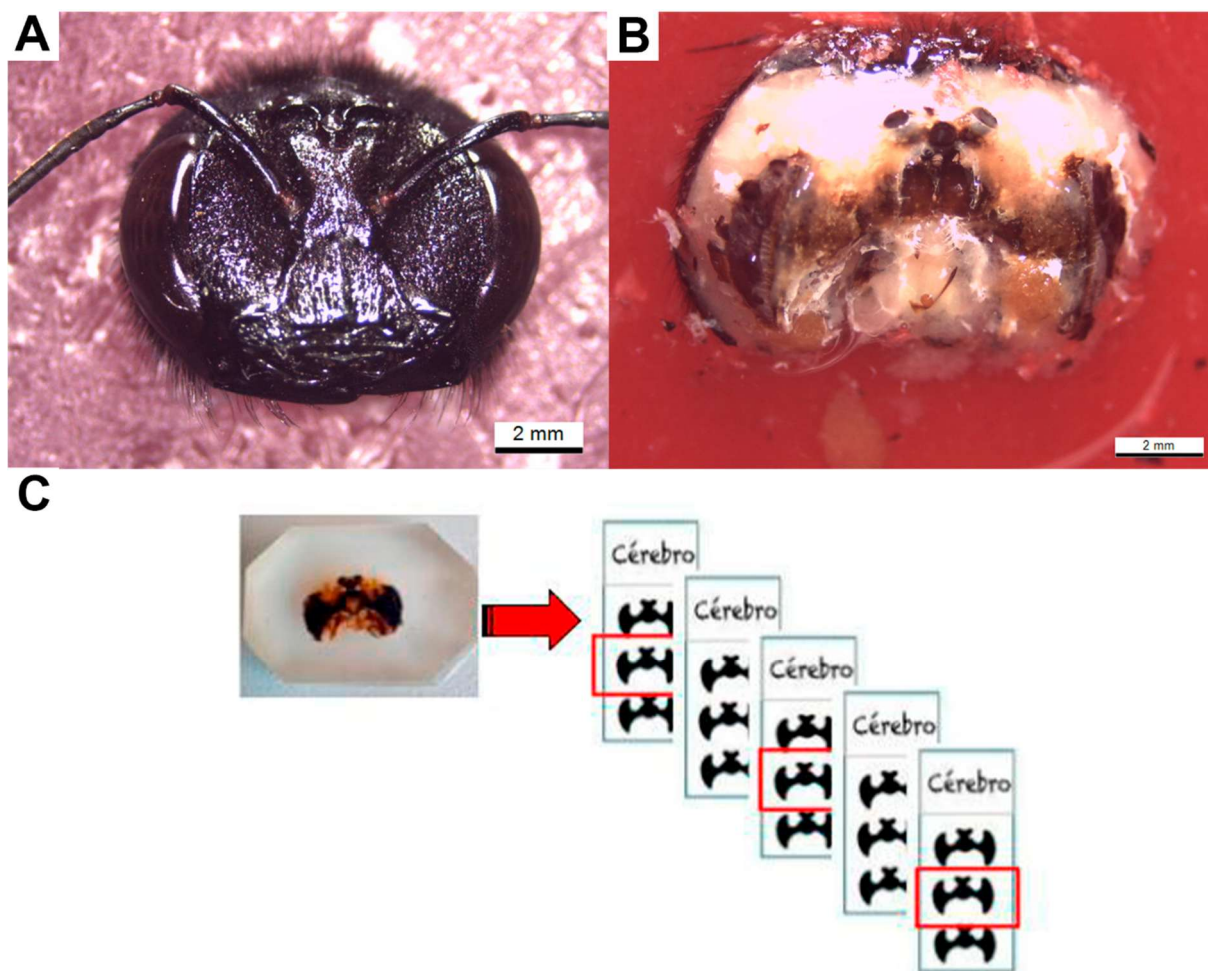
### 2.2.5 Estimativa do Volume das Neurópilas

Para conhecimento do volume dos corpos pedunculados, estimou-se o volume das neurópilas dessas importantes estruturas na espécie *X. frontalis* (n = 3). Para isso, utilizou-se o Princípio de Cavalieri, o qual permite que, por meio da soma das áreas das neurópilas multiplicada pela espessura dos cortes, o cálculo do volume total (Cavalieri, 1635 *apud* Boyce *et al.*, 2010). Desse modo, do conjunto completo das secções coletadas ordenadamente na microtomia, estabeleceu-se que a amostragem ocorreria a cada sexta secção. A primeira secção foi selecionada escolhendo-se um número aleatório de 1 a 6 (período de amostragem escolhido), sendo a próxima a sexta subsequente e assim sucessivamente até o final da estrutura.

As secções selecionadas foram fotografadas em um fotomicroscópio óptico de campo claro (Olympus SC30), utilizando-se o Software Olympus cellSens Entry 1.14. Um hemisfério do cérebro foi selecionado aleatoriamente e as áreas das neurópilas dos corpos pedunculados foram medidas por meio do Software ImageJ 1.53K. A soma das áreas foi multiplicada pela espessura das secções (3  $\mu\text{m}$ ) e pelo período de amostragem (6) para obtenção do volume total. Tais parâmetros foram baseados em estudos que utilizaram espécies de abelhas de porte grande, como operárias de *Bombus impatiens* (Mares *et al.*, 2005; Jones, *et al.*, 2013).

As abelhas também tiveram suas massas corporais pesadas, uma vez que este valor tem uma correlação mais forte com o volume cerebral do que a largura da cabeça (Mares *et al.*, 2005; Riveros e Gronenberg, 2010).

Figura 1 – Dissecação do cérebro de *X. frontalis* para análise histológica e estimativa do volume das neurópilas. A) Cabeça da abelha. B) Cérebro exposto após retirada do tegumento. C) Cérebro emblocado em resina histológica e as lâminas contendo as secções adquiridas após microtomia. Os retângulos vermelhos destacam os cortes histológicos selecionados para medição das áreas das neurópilas.



Fonte: elaborado pela autora.

## 2.3 RESULTADOS

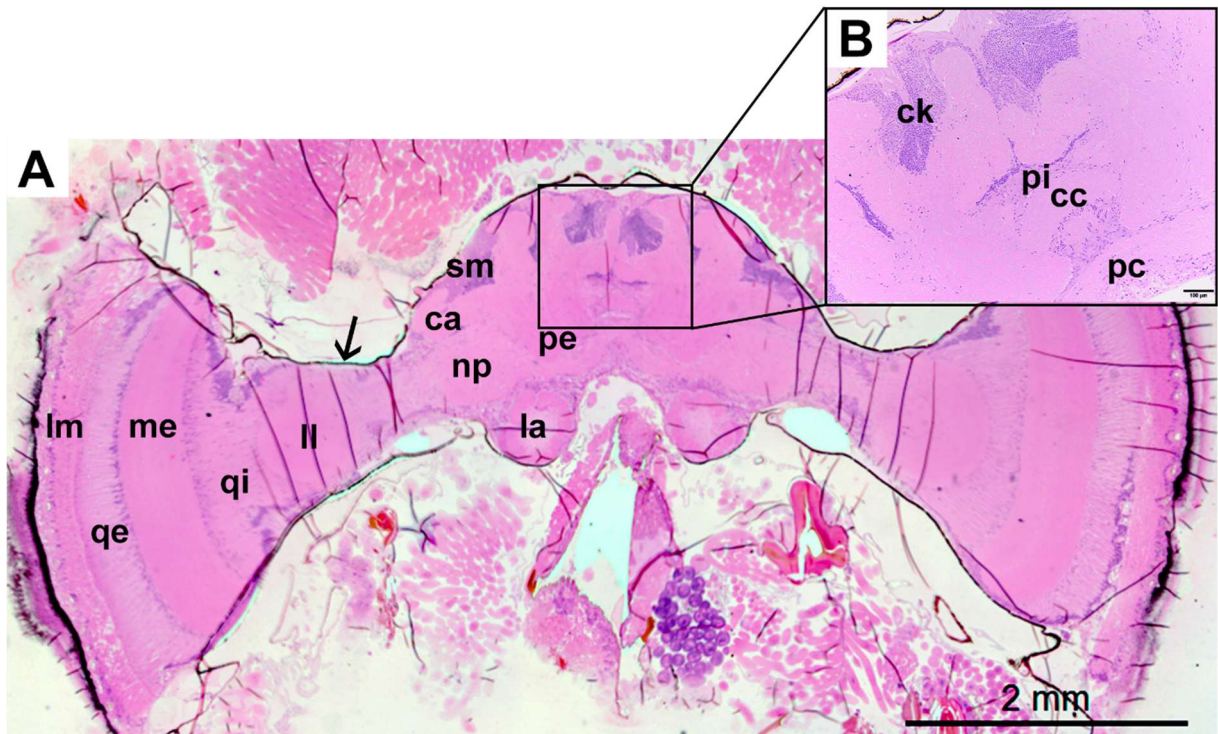
### 2.3.1 Descrição das Principais Estruturas do Cérebro

Por meio da análise histológica, verificou-se que os cérebros das espécies de abelhas *X. suspecta* e *X. frontalis* são formados de três partes: 1. protocérebro – sendo a área predominante – constituído pelos lobos ópticos (LO), corpos pedunculados (CP), complexo central (CC), ponte cerebral (PC) e *pars intercerebralis* (PI); 2. deutocérebro, constituído pelos lobos antenais (LA); e 3. tritocérebro, constituído por dois pequenos lobos posteriores aos LA. Os neurônios que formam essas estruturas organizam-se de modo a delimitar duas regiões: a somata, onde

localizam-se os corpos celulares, e a neurópila, contendo os prolongamentos celulares. Ainda, os órgãos estão envoltos por uma camada escura acelular, a lamela neural esclerotizada (figura 2).

Por não haver diferença entre os cérebros das espécies aqui estudadas, optou-se por apresentar as secções fotografadas apenas da abelha *X. frontalis*.

Figura 2 – Secções histológicas frontais do cérebro da espécie *X. frontalis*. Coloração: HE. A) Cérebro contendo as principais estruturas: lobos ópticos (lâmina, medula e lóbulo) interligados pelos quiasmas, corpos pedunculados (cálice e pedúnculo) e lobos antenais. Magnificação: 40x. Escala: 2 mm. B) Ampliação da região dos corpos pedunculados, na qual pode-se ver as células de Kenyon. Ainda, a *pars intercerebralis*, o complexo central e a ponte cerebral também são vistos. Magnificação: 100x. Escala: 100 µm.



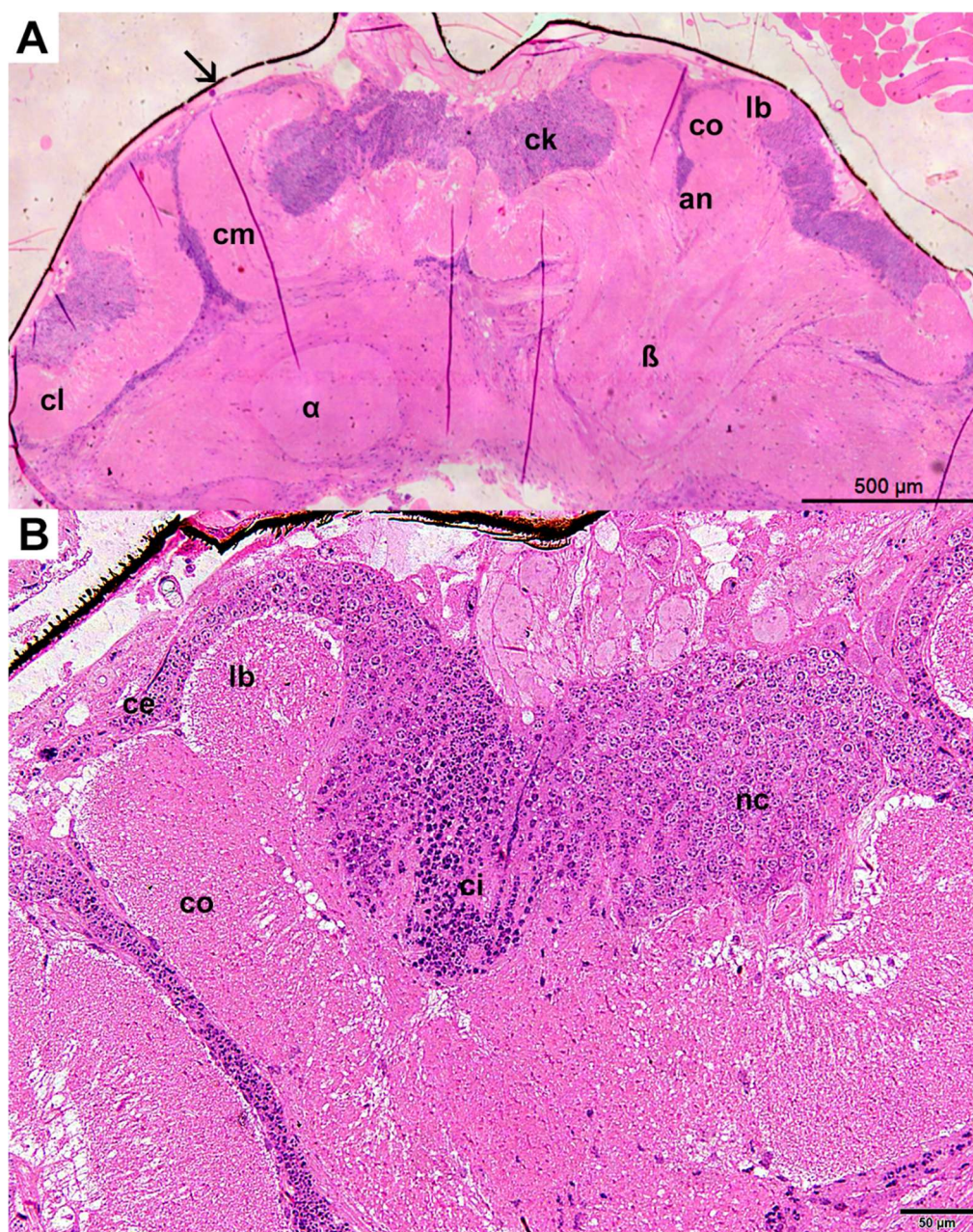
Fonte: elaborado pela autora.

lm: lâmina; qi: quiasma interno; qe: quiasma externo; ll: lóbulo; ca: cálice; pe: pedúnculo; la: lobos antenais; ck: células de Kenyon; pi: *pars intercerebralis*; cc: complexo central; pc: ponte cerebral; sm: somata; np: neurópila; seta: lamela neural esclerotizada.

Os CP estão presentes em pares nos hemisférios cerebrais, sendo formados por dois cálices, um médio e um lateral, e pelo pedúnculo. Os cálices possuem a borda, denominada lábios, a parede, chamada de colar, e o fundo, ou anel basal. O cálice médio é mais fechado que o lateral. O pedúnculo apresenta as projeções alfa e beta (figura 3 – A).

No interior dos cálices, foram identificadas as CK do tipo compactas internas, ocupando a região central, e as CK não compactas na periferia. As CK do tipo compactas externas foram localizadas ao redor dos cálices (figura 3 – B).

Figura 3 – Secções histológicas frontais do cérebro da espécie *X. frontalis*, mostrando a região dos corpos pedunculados. Coloração: HE. A) Pares de corpos pedunculados nos dois hemisférios cerebrais. Magnificação: 100x. Escala: 500  $\mu$ m. B) Cálice médio, possuindo os tipos de células de Kenyon. Magnificação: 200x. Escala: 50  $\mu$ m.



Fonte: elaborado pela autora.

cl: cálice lateral; cm: cálice médio; ck: células de Kenyon; lb: lábio; co: colar; ci: células compactas internas; ce: células compactas externas; nc: células não compactas; seta: lamela neural esclerotizada;  $\alpha$ : alfa;  $\beta$ : beta.

Nos lobos ópticos, há três massas de neurópila, sendo elas a lâmina, a medula e o lóbulo. Entre a lâmina e a medula, encontra-se quiasma externo, e entre a medula e o lóbulo, o quiasma interno (figura 4).

Figura 4 – Secção histológica frontal do cérebro da espécie *X. frontalis*, mostrando os lobos ópticos. Coloração: HE. Magnificação: 100x. Escala: 500 µm.

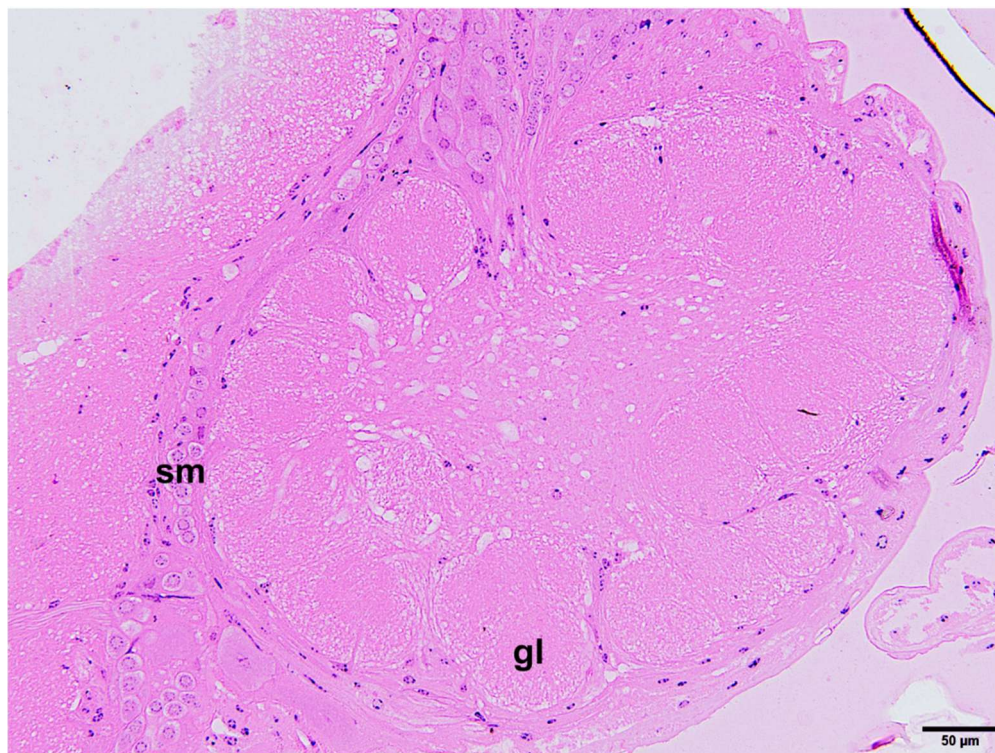


Fonte: elaborado pela autora.

lm: lâmina; qe: quiasma externo; me: medula; qi: quiasma interno; ll: lóbulo.

Os lobos antenais contêm vários glomérulos circundando-os, possuindo uma neurópila compacta. Na região central, a neurópila é menos densa (figura 5).

Figura 5 – Secção histológica frontal do cérebro da espécie *X. frontalis*, mostrando um lobo antenal. Coloração: HE. Magnificação: 20x. Escala: 50  $\mu$ m.



Fonte: elaborado pela autora.

sm: somata; gl: glomérulo.

### 2.3.2 Volume das Neurópilas

Das abelhas coletadas, 3 indivíduos da espécie *X. frontalis* tiveram o volume das neurópilas dos corpos pedunculados estimado. A massa corporal dos indivíduos também foi pesada (tabela 1).

Tabela 1 – Volume das neurópilas dos corpos pedunculados e lobos antenais da espécie *X. frontalis* e sua relação com a massa corporal.

Abelhas	Corpos pedunculados (mm <sup>3</sup> )	Massa corporal (g)	Volume relativo (mm <sup>3</sup> )
<i>X. frontalis</i> 1	381,59	1,56	244,60
<i>X. frontalis</i> 2	278,63	1,34	207,93
<i>X. frontalis</i> 3	225,42	1,67	134,98

Fonte: elaborado pela autora.

## 2.4 DISCUSSÃO

As espécies de abelhas *X. suspecta* e *X. frontalis* tiveram as principais estruturas cerebrais descritas histologicamente, sendo elas: os corpos pedunculados, envolvidos no aprendizado e na integração sensorial; os lobos ópticos, responsáveis pela visão; e os lobos antenais, os centros olfatórios da abelha (Nocelli *et al.*, 2011).

O padrão de organização das estruturas cerebrais descritas para as espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*, ambas consideradas parassociais, é semelhante àquele relatado para abelhas sociais, como *Apis mellifera* (Nocelli *et al.*, 2011; Azevedo e Nocelli, 2020), *Bombus* spp. (Jones *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2020; Rother *et al.*, 2021) e *Augochlorella aurata* (Pahlke *et al.*, 2019), por exemplo. Na espécie facultativamente social *Megalopta genalis* (Smith *et al.*, 2010) e na espécie solitária *Centris analis* (Tadei *et al.*, 2024), o mesmo padrão também foi observado.

O volume das neurópilas dos corpos pedunculados aqui estimado para a espécie *X. frontalis* mostrou-se maior do que aqueles encontrados em abelhas de porte grande, como *Bombus impatiens* (Mares *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2013; Gowda e Gronenberg, 2019).

Os corpos pedunculados dos insetos, assim como o córtex e o hipocampo dos mamíferos, são os centros de aprendizagem e integração sensorial (Cruz-Landim, 2009; Nocelli *et al.*, 2011). Para as abelhas, os corpos pedunculados são estruturas importantes para a realização de diversas atividades, como o forrageamento e a nidificação, pois processam informações vindas dos lobos ópticos e dos lobos antenais, por exemplo (Mobbs, 1982; Mobbs, 1985).

Há evidências de que o tamanho do cérebro das abelhas está relacionado com a capacidade de aprendizagem, como foi observado em *Apis mellifera*, *Bombus* spp., *Osmia latreillei*, *Megachile willughbiella*, *Rhodanthidium sticticum*, *Andrena* sp., *Flavipanurgus venustus* e *Lasioglossum* spp. (Collado *et al.*, 2021). As diferenças na habilidade de aprendizagem dessas abelhas estão positivamente relacionadas com o tamanho absoluto do cérebro, mas não com seu tamanho relativo (Collado *et al.*, 2021).

O nível de socialidade também pode interferir nas estruturas cerebrais, como foi observado na espécie de abelha primitivamente social *Augochlorella aurata*, na qual o tamanho dos cálices dos corpos pedunculados e dos lobos antenais das abelhas fundadoras dos ninhos foi maior do que os das operárias (Pahlke *et al.*, 2019). Na espécie de abelha facultativamente eussocial *Megalopta genalis*, a qual pode nidificar de forma social ou solitária, verificou-se que

o volume do corpo celular das células de Kenyon é maior nos indivíduos sociais, indicando que tal fato pode estar associado à complexidade do comportamento social (Smith *et al.*, 2010).

Sendo o cérebro o órgão-alvo de inseticidas neurotóxicos, as diferentes atividades realizadas pelas abelhas, necessárias para a sua sobrevivência e manutenção das espécies, podem ser afetadas quando esses organismos são expostos a concentrações residuais desses produtos, como alterações significativas na locomoção das abelhas, observadas na espécie solitária *Centris analis* (Tadei *et al.*, 2024) e na abelha social sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Tomé *et al.*, 2012); danos na memória e no aprendizado, como verificado nas espécies sociais *Apis mellifera* (Yang *et al.*, 2012) e naquelas pertencentes à tribo Bombini (Smith *et al.*, 2020), entre outros efeitos adversos.

Sendo assim, a integridade das estruturas cerebrais é primordial para a manutenção dos indivíduos da espécie *X. frontalis*, pois o comprometimento do cérebro de uma abelha não social em nidificação pode ter consequências ecológicas drásticas, uma vez que não há a presença de outros indivíduos para sua substituição, como acontece nas colônias de abelhas sociais (Sgolastra *et al.*, 2019), sendo essencial o conhecimento do volume das neurópilas para averiguar possíveis danos causados por agentes estressores, como os agrotóxicos com ação neurotóxica.

Além do tamanho do cérebro, o tamanho corporal da abelha também é importante, pois está associado à uma maior produção de calor metabólico, o que é necessário para manter a temperatura corporal alta o suficiente para voar, o que já foi observado em *X. frontalis*, a qual foi mais eficiente na coleta de néctar quando comparada com *X. cearensis*, uma espécie de porte menor (Harano e Hrcir, 2023).

Portanto, a caracterização morfológica do cérebro da espécie *X. frontalis*, a qual possui estruturas cerebrais com um volume grande, corpo avantajado e baixa socialidade, é primordial para servir de base para estudos futuros envolvendo bioensaios ecotoxicológicos com essas espécies nativas, importantes na polinização de plantas silvestres e cultivadas.

## 2.5 CONCLUSÕES

Por meio da caracterização morfológica, verificou-se que as espécies *X. suspecta* e *X. frontalis* possuem cérebros com estruturas semelhantes. Ainda, o cérebro dessas abelhas tem o mesmo padrão observado em outras abelhas, assim como nos demais insetos. O volume das neurópilas dos corpos pedunculados das abelhas *X. frontalis* mostrou-se maior que aqueles relatados para abelhas de grande porte. O estudo da morfologia cerebral dessas espécies poderá

servir de base para investigações futuras sobre o efeito de inseticidas neurotóxicos em suas funções cerebrais.

## REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, P.; NOCELLI, R. C. F. Revisão da anatomia do sistema nervoso central de *Apis mellifera*: uma base teórica para estudos ecotoxicológicos. **Revista da Biologia**, v. 1, p. 10-20, 2020.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; GESTEL, C. A. M.; MOMMAERTS, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 973-992, 2012.
- BOUCHEBTI, S.; ARGANDA, S. Insect lifestyle and evolution of brain morphology. **Current Opinion in Insect Science**, v. 42, p. 90-96, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.09.012>. Acesso em: 27/11/2024.
- BOYCE, R. W.; DORPH-PETERSEN, K-A; LYCK, L.; GUNDERSEN, H. J. G. Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. **Toxicologic Pathology**, v. 38, n. 7, p. 1011-1025, 2010.
- BULLOCK, T. H.; HORRIDGE, G. A. **Structure and function in the nervous systems of invertebrates**. San Francisco: Freeman, 1965.
- CAVALIERI, B. **Geometria indivisibilibus continuorum**. Nova quadam ratione promota. Bononiae: Typis Clementis Feronij, 1635. Reprinted as **Geometria degli indivisibili**. Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese, 1966.
- COLLADO, M. Á.; MONTANER, C. M.; MOLINA, F. P.; SOL, D.; BARTOMEUS, I. Brain size predicts learning abilities in bees. **R. Soc. Open Sci.**, v. 8, n. 201940, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsos.201940>. Acesso em: 13/07/2022.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009.
- FARRIS, S. M.; ROBINSON, G. E.; FAHRBACH, S. E. Experience- and age-related outgrowth of intrinsic neurons in the mushroom bodies of the adult worker honeybee. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 16, p. 6395-6404, 2001.
- GOWDA, V.; GRONEMBERG, W. Brain composition and scaling in social bee species differing in body size. **Apidologie**, v. 50, p. 779-792, 2019.
- HARANO, K.; HRNCIR, M. Big in the tropics—Are there thermal advantages of large body size for carpenter bees in hot climates? **Ecological Entomology**, v. 48, n. 3, p. 358-370, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/een.13230>. Acesso em: 15/07/2024.
- HEARD, M. S.; BAAS, J.; DORNE, J. L.; LAHIVE, E.; ROBINSON, A. G.; RORTAIS, A.; SPURGEON, D. J.; SVENDSEN, C.; HESKETH, H. Comparative toxicity of pesticides and environmental contaminants in bees: are honey bees a useful proxy for wild bee species? **Science of the Total Environment**, v. 578, p. 357-365, 2017.

JONES, B. M.; LEONARD, A. S.; PAPA, D. R.; GRONENBERG, W. Plasticity of the worker bumblebee brain in relation to age and rearing environment. **Brain Behav. Evol.**, v. 82, n. 4 p. 250-261, 2013.

KLOPPENBURG, P. Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). **The Journal of Comparative Neurology**, v. 363, n. 2, p. 333-343, 1995.

MARES, S.; ASH, L.; GRONENBERG, W. Brain allometry in bumblebee and honey bee workers. **Brain Behav Evol**, v. 66, n. 1, p. 50-61, 2005.

MOBBS, P. G. The brain of the honey bee *Apis mellifera* L. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 298, p. 309-354, 1982.

MOBBS, P. G. Brain structure. *In*: KERKUT, G.; GILBERT, L. I. (editors). **Comprehensive insect physiology pharmacology and biochemistry**: Nervous systems: structure and motor function. V. 5. Oxford: Pergamon Press, 1985.

NOCELLI, R. C. F. ; ROAT, T. C. ; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Social Insects - morphophysiology of the nervous system. *In*: STEWART, E. M. (Org.). **Social Insects - Structure, Function, and Behavior**. 1ed. New York: Nova Publishers, Hauppauge, 2011.

PAHLKE, S.; JAUMANN, S.; SEID, M. A.; SMITH, A. R. Brain differences between social castes precede group formation in a primitively eusocial bee. **The Science of Nature**, v. 106, n. 49, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00114-019-1644-7>. Acesso em: 14/09/2024.

RIVEROS, A. J., GRONENBERG, W. Brain allometry and neural plasticity in the bumblebee *Bombus occidentalis*. **Brain Behav. Evol.**, v. 75, p. 138148, 2010.

ROTHER, L.; KRAFT, N.; SMITH, D. B.; JUNDI, B.; GILL, B. J.; PFEIFFER, K. A micro-CT-based standard brain atlas of the bumblebee. **Cell Tissue Res**, v. 386, p. 29-45, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00441-021-03482-z>. Acesso em: 20/06/2022.

SGOLASTRA, F.; HINAREJOS, S.; PITTS-SINGER, T. L.; BOYLE, N.K.; JOSEPH, T.; LÜCKMANN, J.; RAINE, N. E.; SINGH, R.; WILLIAMS, N. M.; BOSCH, J. Pesticide exposure assessment paradigm for solitary bees. **Environmental Entomology**, v. 48, n. 1, p. 22-35, 2019.

SMITH, A. R.; SEID, M. A.; JIMENEZ, L. C.; WCISLO, W. T. Socially induced brain development in a facultatively eusocial sweat bee *Megalopta genalis* (Halictidae). **Proc. R. Soc. B**, v. 277, p. 2157-2163, 2010.

SMITH, D. B.; ARCE, A. N.; RAMOS RODRIGUES, A.; BISCHOFF, P. H.; BURRIS, D.; AHMED, F.; GILL, R. J. Insecticide exposure during brood or early-adult development reduces brain growth and impairs adult learning in bumblebees. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, 20192442, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.2442>. Acesso em: 13/07/2023.

STRAUSFELD, N. J. Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. **J. Comp. Neurol.**, v. 450, p. 4-33, 2002.

TADEI, R.; SILVA, C. I.; SILVA, E. C. M.; MALASPINA, O. Effects of the insecticide acetamiprid and the fungicide azoxystrobin on locomotion activity and mushroom bodies of solitary bee *Centris analis*. **Chemosphere**, v. 364, n. 143254, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143254>. Acesso em: 20/02/2025.

TOMÉ, H. V. V.; MARTINS, G. F.; LIMA, M. A. P.; CAMPOS, L. A. O.; GUEDES, R. N. C. Imidacloprid-induced impairment of mushroom bodies and behavior of the native stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, e38406, 2012.

YANG, E. C.; CHANG, H. C.; WU, W. Y.; CHEN, Y. W. Impaired olfactory associative behavior of honey bee workers due to contamination of Imidacloprid in the larval stage. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, e49472, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049472>. Acesso em: 13/07/2023.

### 3 CAPÍTULO 3

Caracterização do intestino médio das abelhas *Xylocopa suspecta* e *Xylocopa frontalis*

Characterization of *Xylocopa suspecta* and *Xylocopa frontalis* midgut

#### Resumo

Os insetos são representados por diversas espécies com diferentes hábitos alimentares; contudo, o sistema digestório dessa ampla classe de organismos segue um padrão, sendo constituído de um tubo longo que vai da cavidade oral ao ânus, dividido em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Adaptações morfofuncionais no canal alimentar podem existir de acordo com o hábito alimentar e o nível de socialidade do inseto. Com isso, o propósito desta tese foi caracterizar o intestino médio das abelhas parassociais *Xylocopa suspecta* e *Xylocopa frontalis*. Por meio de análises histológica, histoquímica e ultraestrutural, foi observado que o intestino médio dessas espécies, em todas as suas porções, é composto por um epitélio simples, formado essencialmente por células digestivas colunares e ninhos basais de células regenerativas, apoiados em uma lâmina basal acidófila, e por fibras musculares circulares e longitudinais contornando externamente o epitélio. Na face apical do tubo intestinal, há a matriz peritrófica extracelular envolvendo o lúmen e o alimento. Ainda, as células digestivas localizadas imediatamente acima do ninho se organizam de acordo com o grau de diferenciação, o qual pode ser notado pelo desenvolvimento de cavidades com microvilosidades em seu interior. Na porção mediana do intestino médio, verificou-se que as cavidades possuem material eletrodense, o qual também aparece em vacúolos distribuídos no citoplasma das células digestivas que envolvem essa cavidade, principalmente na região apical dessas células. As cavidades extracelulares e os vacúolos intracelulares foram positivos para carboidratos, os quais podem ter relação com a formação das microvilosidades. Ainda, as cavidades foram positivas para proteínas. Depósitos lipídicos também foram identificados no citoplasma das células digestivas da porção mediana do intestino médio. A lâmina basal apresentou-se formada por uma área amorfa contornada por elementos organizados, sendo positiva para carboidratos e proteínas. Grãos de pólen foram identificados na face luminal do órgão, mostrando que as plantas utilizadas pelas abelhas são melitófilas e, ainda, algumas espécies possuem anteras poricidas. Alguns desses grãos encontraram-se digeridos, indicando serem parte da dieta das abelhas. As características do epitélio intestinal aqui observadas são semelhantes aquelas encontradas em outras abelhas, contudo possuem peculiaridades como a formação de cavidades

e uma lâmina basal com subestruturas organizadas. Sendo assim, as abelhas do gênero *Xylocopa* têm uma arquitetura epitelial que necessita ser melhor estudada para compreensão de sua fisiologia. Tais dados são importantes para colaborar com futuros estudos ecotoxicológicos, já que essas espécies forrageiam em cultivos de importância econômica.

Palavras-chave: abelhas parassociais; abelhas carpinteiras; sistema digestório.

## Abstract

Insects are represented by several species with different feeding habits; however, the digestive system of this broad class of organisms follows a pattern, consisting of a long tube that runs from the oral cavity to the anus, divided into foregut, midgut, and hindgut. Morphological and functional adaptations in the alimentary canal may exist according to the insect's feeding habits and level of sociality. Therefore, the purpose of this thesis was to characterize the midgut of the parasocial bees *Xylocopa suspecta* and *Xylocopa frontalis*. Through histological, histochemical, and ultrastructural analyses, it was observed that the midgut of these species, in all its portions, is composed of a simple epithelium, formed primarily by columnar digestive cells and nests of regenerative cells, supported by an acidophilic basal lamina, and by circular and longitudinal muscle fibers externally surrounding the epithelium. On the apical surface of the intestinal tube, there is an extracellular peritrophic matrix surrounded by the lumen and food. Nevertheless, digestive cells located immediately above the nest are organized according to their degree of differentiation, as evidenced by the development of cavities with microvilli within them. In the median portion of the midgut, the cavities contain electron-dense material, which is also evident in vacuoles distributed throughout the cytoplasm of the digestive cells surrounding this cavity, particularly in the apical region of these cells. The extracellular cavities and intracellular vacuoles may stain positive for carbohydrates, which are related to the formation of microvilli. Furthermore, the cavities stained positive for proteins. Lipid deposits were also identified in the cytoplasm of digestive cells in the median portion of the midgut. The basal lamina was formed by an amorphous area surrounded by organized elements, being positive for carbohydrates and proteins. Pollen grains were identified on the luminal surface of the organ, demonstrating that the plants used by the bees are melittophilous, and that some species also have poricidal anthers. Some of these grains were found digested and became part of the bees' diet. The characteristics of the intestinal epithelium observed here are similar to those found in other bees, however they have peculiarities such as the formation of cavities and a basal lamina with organized substructures. Therefore, bees of the genus *Xylocopa* have an epithelial architecture that requires further study to understand their physiology. This data is important for future ecotoxicological studies, as these species forage on economically important crops.

Keywords: parasocial bees; carpenter bees; digestive system.

### 3.1 INTRODUÇÃO

As características estruturais, morfológicas e funcionais do sistema digestório dos insetos têm uma correlação mais forte com a filogenia das diferentes espécies do que com seus hábitos alimentares (Terra e Ferreira, 2005; Santos *et al.*, 2017).

As abelhas e os demais insetos alados evoluíram ao longo de duas linhagens: Polyneoptera (grilos, gafanhoto, baratas, louva-a-deus, bichos-pau entre outros) e Eumetabola, a qual divide-se em Paraneoptera (cigarras, percevejos, piolhos, tripes entre outros) e Holometabola (besouros, abelhas, formigas, vespas, moscas-da-fruta, borboletas entre outros) (Simon *et al.*, 2009). As fontes de alimento desses insetos são muitas, incluindo grama, fungos, líquidos de plantas ou de insetos, néctar, pólen entre outras (Bution *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2009; Nardi e Bee, 2012; Carneiro *et al.*, 2018).

O grupo Holometabola (insetos que passam por metamorfose completa) reúne a maior diversidade de espécies de insetos (Rainford *et al.*, 2014). Dentre as ordens que compõem o grupo Holometabola, as que concentram a maior riqueza de espécies são Coleoptera (besouros), Hymenoptera (abelhas, formigas, vespas entre outros), Lepidoptera (borboletas) e Diptera (moscas) (Grimaldi e Engel, 2005; Mayhew, 2018). Na ordem Hymenoptera, há o grupo Aculeata, do qual fazem parte as abelhas, vespas e formigas, segregado em três superfamílias: Chrysoidea, Vespoidea e Apoidea (Brothers, 1999). Os hábitos alimentares variam nesse grupo, podendo existir espécies fitófagas, como as abelhas, parasitóides, como as vespas, e predatórias, como as formigas, sendo que a maioria dos Aculeata é parasitóide ou predadora de outros insetos (Grimaldi e Engel, 2005). É provável que o grupo Aculeata evoluiu de algum parasita especializado, o qual as fêmeas usavam seu ovipositor para ferocar e imobilizar as larvas hospedeiras, botando ovo nelas (Terra, 1988).

Abelhas e vespas esfecóides formam a superfamília Apoidea e, embora tenham similaridades, diferenciam-se em seus hábitos alimentares, já que as abelhas coletam pólen das flores como fonte de proteína para alimentar suas larvas – possuindo para isso pelos corporais – enquanto que as vespas capturam insetos e aranhas para suas crias (Melo, 1999; Michener, 2007).

Apesar dos insetos serem representados por diversas espécies com diferentes hábitos alimentares, o sistema digestório dessa ampla classe de organismos segue um padrão, sendo constituído de um tubo longo que vai da cavidade oral ao ânus, dividido em intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Cruz-Landim, 2009; Silva-Zacarin *et al.*, 2011; Chapman,

2013). Entretanto, o hábito alimentar e o nível de socialidade do inseto podem refletir em adaptações morfofuncionais do canal alimentar (Nation, 2008).

O intestino anterior dos insetos é comumente dividido em cavidade oral, faringe, esôfago, papo e proventrículo (Cruz-Landim, 2009). A faringe é responsável pela ingestão e passagem de comida para o esôfago, sendo este um tubo que liga a faringe ao papo (Cruz-Landim, 2009). O papo é um órgão de armazenamento, ou também de digestão, como no caso das abelhas que possuem enzimas para hidrolisar o néctar (Terra e Ferreira, 1994). O proventrículo é um órgão que varia em seu formato, podendo formar uma válvula entre o papo e o intestino médio para controlar a passagem de comida, como no caso das abelhas e dos gafanhotos, ou um aparelho de moagem com placas cuticulares ou dentes, como nas baratas e nos besouros (Terra, 1988; Chapman, 2013).

O intestino médio é o principal local onde a digestão e a absorção de nutrientes ocorrem. Nas abelhas, o intestino médio é um tubo simples, mas em outros insetos, como grilos, baratas, besouros entre outros, ele pode apresentar divertículos laterais chamados cecos gástricos (Chapman, 2013). Entre o intestino médio e o intestino posterior, na maioria dos insetos, há pequenos tubos com fundo cego, os túbulos de Malpighi, os quais participam da excreção juntamente com o intestino posterior (Silva-Zacarin *et al.*, 2011).

O intestino posterior é formado pelo piloro, íleo e reto (De Paula *et al.*, 2022). O piloro é o local de entrada dos túbulos de Malpighi, recebendo suas excreções e os resíduos de comida vindos do intestino médio; o íleo é um tubo estreito que pode conter microrganismos simbiotes, como no caso dos cupins; e no reto, ocorre a absorção de água e íons e a formação das fezes (Chapman, 2013).

O intestino dos insetos é constituído por um tecido epitelial que na maioria das espécies é do tipo simples colunar, o qual está apoiado sobre uma lâmina basal e é circundado por fibras musculares (Cruz-Landim, 2009). No intestino médio, onde a maior parte da digestão e da absorção ocorrem, podem ser encontrados três tipos de células, baseados em suas funções, sendo elas digestivas, endócrinas e regenerativas (Caccia *et al.*, 2019).

As células digestivas são responsáveis pela digestão do alimento, por meio da secreção de enzimas no lúmen do órgão, como as glicosidases e endopeptidases presentes no intestino médio das abelhas, ou por meio de proteínas da membrana celular; e também pela absorção de água e nutrientes (Terra e Ferreira, 2020). Geralmente, as células digestivas são caracterizadas por apresentarem um núcleo central, membrana apical contendo inúmeras projeções, denominadas microvilosidades, e membrana basolateral com invaginações, o labirinto basal (Caccia *et al.*, 2019). Contudo, características ultraestruturais peculiares podem ser encontradas

em células de diferentes regiões do intestino médio, de acordo com as principais funções desempenhadas por elas e os hábitos alimentares dos organismos (Caccia *et al.*, 2019). Aquelas envolvidas principalmente na secreção de enzimas, possuem grânulos em seu citoplasma apical, retículo endoplasmático desenvolvido e lisossomos; enquanto que as células envolvidas na absorção possuem longas microvilosidades, um labirinto basal extenso e vesículas de armazenamento (Serrão *et al.*, 2008, Azevedo *et al.*, 2009).

Ainda, nas abelhas e em outros insetos que consomem alimento sólido, as células digestivas são responsáveis pela produção da matriz peritrófica, uma estrutura constituída por uma rede fina de quitina, glicosaminoglicanos, glicoproteínas e proteínas (Lehane, 1997; Teixeira *et al.*, 2015). A matriz peritrófica separa o conteúdo luminal do epitélio, delimitando o local de ação de diferentes classes de enzimas, servindo também como proteção contra a abrasão causada pelos alimentos e contra patógenos (Terra e Ferreira, 1994; Hegedus, 2009). Em insetos zoofítopagos, como o percevejo, não há matriz peritrófica, mas uma membrana lipoprotéica com funções similares, a membrana perimicrovilar (Fialho *et al.*, 2009). Em insetos como os besouros, dentre os quais há espécies com diferentes hábitos alimentares, a matriz peritrófica é ausente na maioria deles (Nardi e Bee, 2012).

Em diferentes ordens de insetos, células endócrinas podem ser encontradas espalhadas entre as células digestivas (Brown *et al.*, 1985; Raes e Verbeke, 1994; Rocha, *et al.*, 2014; Li, *et al.*, 2018). Essas células produzem e secretam peptídeos bioativos importantes para o funcionamento do intestino e para a homeostase do inseto (Wu *et al.*, 2020). Elas são diferenciadas morfológicamente em células “abertas”, quando têm formato alongado, o que possibilita que estejam em contato com a lâmina basal e que se “abram” para o lúmen, ou seja, elas estão apoiadas na lâmina basal e se estendem até a região apical do epitélio; e células “fechadas”, as quais podem ter diferentes formatos, mas não alcançam o lúmen e o contato com a lâmina basal é limitado (Nishiitsutsuji-Uwo e Endo, 1981).

Em algumas ordens de insetos, podem ser observados dois outros tipos celulares ao longo do epitélio do intestino médio, as *goblet cells* e as células oxínticas ou *copper cells*, ambas envolvidas com a modificação do pH do lúmen intestinal (Caccia *et al.*, 2019).

As *goblet cells* estão presentes apenas no estágio larval de insetos da ordem Lepidoptera (Endo e Nishiitsutsuji-Uwo, 1981; Gomes *et al.*, 2013) e em indivíduos adultos de algumas espécies de formigas (Bution e Caetano, 2010). Apesar do termo “*goblet cell*” se referir à células secretoras de muco, as *goblet cells* presentes no intestino dos insetos não possui tal função, porém uma semelhança superficial com as *goblet cells* dos vertebrados fez com que recebessem essa denominação (Anderson e Harvey, 1966). Nos insetos, essas células possuem

uma invaginação profunda na membrana apical, criando uma câmara na qual cada microvilosidade está associada a uma mitocôndria, o que caracteriza uma intensa atividade de transporte de íons e moléculas (Anderson e Harvey, 1966). No caso dos lepidópteros e das formigas, o transporte de íons ocorre para aumentar o pH do lúmen intestinal, estando tal peculiaridade relacionada aos seus hábitos alimentares, pois esses insetos são predominantemente fitófagos e o material ingerido contém metabólitos secundários tóxicos, formando complexos insolúveis que são prevenidos de agir em pH alcalino (Caccia *et al.*, 2019).

As características morfológicas e ultraestruturais presentes nas *goblet cells* também são observadas nas células oxínticas. As células oxínticas são encontradas em Dípteros, os quais se alimentam de plantas em decomposição, fungos e bactérias, e estão envolvidas na acidificação do pH luminal do intestino médio por meio da produção de ácido gástrico, o que facilita a digestão de proteínas, absorção de metais e minerais e limita a sobrevivência de microrganismos ingeridos (Terra *et al.*, 1988; Miguel-Aliaga *et al.*, 2018).

O canal alimentar dos insetos, sendo uma conexão direta com o exterior, torna o epitélio intestinal suscetível a danos que podem ser causados por patógenos e substâncias tóxicas ingeridos com o alimento, além de que a passagem do alimento pelo intestino médio gera abrasão mecânica (Caccia *et al.*, 2019). Ainda, há a liberação de células em degeneração para o lúmen, o que indica a constante remodelação epitelial do órgão (Nardi *et al.*, 2010). Sendo assim, na maioria dos insetos, há células regenerativas situadas na base do epitélio intestinal responsáveis por originar todos os tipos celulares do órgão (Raes *et al.*, 1994; Nardi e Bee, 2012; Rocha *et al.*, 2014). As células regenerativas podem ser células únicas no epitélio, como ocorre em Lepidoptera (Endo e Nishiitsutsuji-Uwo, 1981), podem estar agregadas em estruturas denominadas ninhos, como acontece em Hymenoptera (Raes *et al.*, 1994), ou compor bolsas regenerativas que se estendem além da musculatura longitudinal, como observado em Coleoptera (Nardi *et al.*, 2010). Ainda, há espécies de besouro, como *Neoclytus acuminatus* e *Stegobium paniceum*, que não possuem células regenerativas, o que pode estar relacionado ao fato de que não se alimentam ou têm um consumo baixo de alimento (Nardi e Bee, 2012).

A alimentação da maioria das abelhas adultas é baseada principalmente em pólen – rico em proteínas e lipídios importantes no desenvolvimento e maturação – e néctar – principal fonte de carboidratos necessários para o suprimento energético (Silva *et al.*, 2014).

Nas abelhas, assim como na maioria dos insetos, a maior parte da digestão ocorre no lúmen do intestino médio (Cruz-Landim, 2009). As enzimas utilizadas na digestão podem ser

provenientes das glândulas anexas ao tubo digestório, produzidas pelas células digestivas do intestino médio ou por microrganismos presentes no lúmen do órgão (Cruz-Landim, 2009).

A dieta de abelhas sociais depende da casta, pois a larva da rainha recebe *ad libitum* um alimento diferenciado, a geléia real, sendo constituído principalmente de secreção das glândulas mandibulares de operárias e de maior quantidade e variedade de nutrientes determinantes para o desenvolvimento dos ovários e ganho de massa corporal (Asencot e Lensky, 1976). Larvas de operárias, por sua vez, recebem o alimento em quantidades e qualidades diferentes ao longo de seu desenvolvimento (Asencot e Lensky, 1976). Em adultos, os quais se alimentam de pólen e néctar, o mesmo ocorre: nas espécies *Apis mellifera* e *Scaptotrigona postica*, por exemplo, as necessidades nutricionais estão relacionadas com a idade e função, pois forrageiras e machos mais velhos ingerem menos pólen em relação às abelhas mais novas, requerendo grande quantidade de carboidratos para realização de atividades com maior gasto energético, como o vôo (Crailsheim *et al.*, 1992; Szolderits e Crailsheim, 1993; Zerbo *et al.*, 2001).

As larvas de abelhas não sociais recebem alimento com a mesma constituição, pois não há diferenciação dos indivíduos em castas (Silva *et al.*, 2014). No gênero *Xylocopa*, por exemplo, as células de cria são aprovisionadas igualmente com uma massa de pólen e néctar (Anzenberger, 1977; Raju e Rao, 2006), assim como na espécie *Osmia bicorns* (Austin e Gilbert, 2020), na subespécie *Andrena taraxaci orienticola* (Harano e Sasaki, 2024) e outras. Larvas da espécie *Colletes halophilus*, recebem alimento líquido, o qual é constituído por uma grande quantidade de néctar, pólen e, também, pela enzima glicose oxidase adicionada pela fêmea, a qual pode estar relacionada com a conservação do alimento (Sommeijer *et al.*, 2009). Entretanto, as células das larvas de fêmeas são maiores e contêm mais alimento, devido ao dimorfismo sexual de tamanho (Rooijackers e Sommeijer, 2009).

Assim como nas abelhas sociais, as abelhas não sociais adultas apresentam dietas diferentes. Os machos das espécies *Xylocopa latipes* e *X. pubescens* consomem apenas néctar, enquanto que as fêmeas se alimentam de pólen e néctar (Raju e Rao, 2006). Nas espécies do gênero *Andrena*, os machos consomem pólen e néctar, porém em quantidades inferiores às fêmeas (Urban-Mead *et al.*, 2022).

O sistema digestório das abelhas já foi descrito para as espécies sociais, como *Apis mellifera* (Cruz-Landim, 2009; De Paula, 2022) e as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica*, *Trigona spinipes*, *Trigona hypogea* (Serrão e Cruz-Landim, 1996), *Friesella schrottkyi* (Oliveira *et al.*, 2019) e *Melipona quadrifasciata* (Carneiro *et al.*, 2018); e, também, para as abelhas primitivamente sociais *Bombus morio* (Gonçalves *et al.*, 2014). Contudo, o sistema digestório de abelhas não sociais ainda não foi descrito.

Sendo assim, além das abelhas sociais e não sociais diferirem em suas dietas, elas também pertencem a linhagens evolutivas divergentes (Cardinal e Danforth, 2011), o que pode refletir em adaptações no canal alimentar, especialmente no intestino médio dos diferentes grupos de abelhas.

Portanto, o propósito desta tese foi caracterizar o intestino médio das abelhas parassociais *Xylocopa suspecta* e *Xylocopa frontalis* por meio de análises histológica, histoquímica e ultraestrutural, sendo este o primeiro relato sobre o intestino médio dessas abelhas. O conhecimento do intestino dessas abelhas é relevante para estudos ecotoxicológicos, como aqueles que visam elucidar a ação de agrotóxicos em órgãos importantes de espécies de abelhas nativas.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Coleta e Transferências das Abelhas para o Laboratório

Fêmeas adultas das espécies *X. suspecta* (n = 4) e *X. frontalis* (n = 10) foram coletadas em um sistema agroflorestal (SAF), onde não é feito o uso de agrotóxicos, localizado na cidade de Sorocaba (23°35'16.786" S, 47°31'37.302" W); e em uma horta orgânica nas dependências da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba (23°34'55.482" S, 47°31'29.622" W).

Redes entomológicas e potes de plástico com perfurações para a ventilação foram utilizados para a captura das abelhas durante seu forrageio e pouso nas flores. As abelhas coletadas foram acondicionadas em potes de plástico redondos (1 L) com perfurações para entrada de ar, os quais permaneceram dentro de uma caixa de isopor contendo gelo para a diminuição da atividade corporal das abelhas, evitando o estresse. Desse modo, as abelhas foram transportadas para o Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental na Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba (figura 1 – A e B).

No laboratório, os potes contendo as abelhas permaneceram na estufa de incubação do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), em condições controladas de temperatura e umidade (26°C ± 1°C, 70% ± 10% respectivamente, no escuro) até a dissecação do órgão de interesse.

### 3.2.2 Dissecação do Intestino Médio

Após crioanestesia (+/- 14 °C, 15 minutos), cada uma das abelhas (*X. suspecta* n = 4; *X. frontalis* n = 10) foi posicionada em decúbito dorsal em uma placa de cera. Sob estereomicroscópio (Leica EZ4HD), o intestino foi retirado da cavidade abdominal e

seccionado, com uma micro tesoura, próximo ao papo e ao intestino posterior e dividido em três porções: anterior, mediana e posterior (figura 1 – C e D).

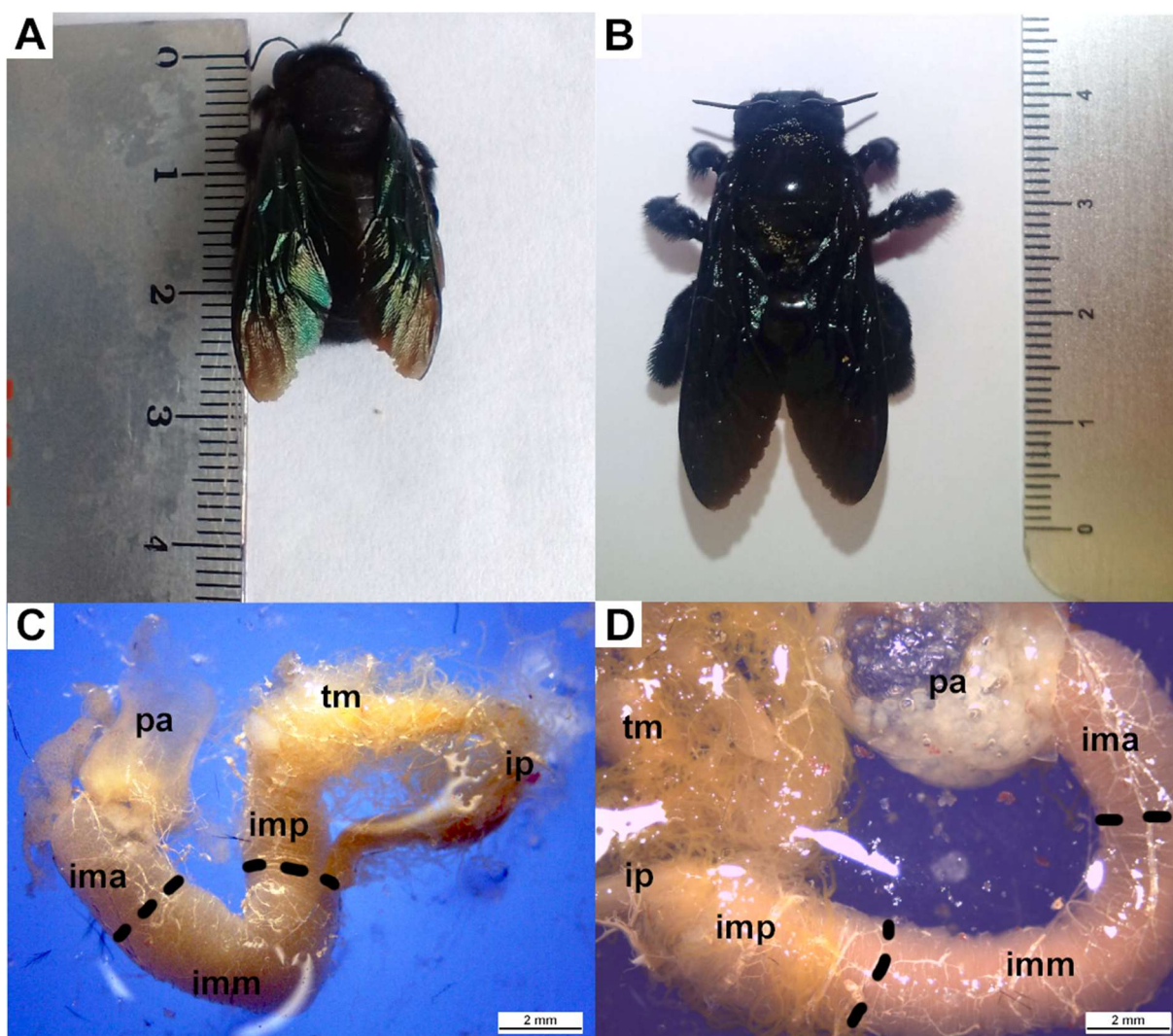
As porções do intestino médio foram, então, transferidas para uma solução fixadora (paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M, pH 7,2-7,4), na qual permaneceram por 24 horas, sob refrigeração.

### **3.2.3 Processamento Histológico e Microtomia**

Após a etapa de fixação, as amostras foram processadas para emblocamento em resina histológica. Para isso, elas foram lavadas com PBS (0,1 M, pH 7,2-7,4), gradualmente desidratadas em etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%), sob refrigeração, e, por fim, incluídas em resina histológica (Historesin Embedding Kit, Leica).

Após a completa polimerização da resina, cada bloco contendo um fragmento foi seccionado longitudinalmente (3  $\mu\text{m}$ ), utilizando-se um micrótomo (Leica RM2255). As secções adquiridas foram colocadas em lâminas para microscopia. As lâminas contendo as secções foram utilizadas para as caracterizações histológica e histoquímica do órgão.

Figura 1 – Abelhas coletadas e seus respectivos intestinos dissecados. A) *X. suspecta*. B) *X. frontalis*. C) Intestino médio de *X. suspecta*. D) Intestino médio de *X. frontalis*.



Fonte: elaborado pela autora.

ima: intestino médio anterior; imm: intestino médio mediano; imp: intestino médio posterior; pa: papo; tm: túbulos de Malpighi; ip: intestino posterior.

### 3.2.4 Caracterização Histológica

Para cada porção do intestino médio (anterior, mediana e posterior) de ambas as espécies (*X. suspecta* n = 4; *X. frontalis* n = 10), foram analisadas 5 lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), contendo 3 secções histológicas sequenciais em cada uma. As secções coradas foram analisadas ao microscópio óptico de campo claro (Olympus SC30) e fotodocumentação (Software Olympus cellSens Entry 1.14).

### 3.2.5 Caracterização Histoquímica

Para cada indivíduo (*X. suspecta* n = 4; *X. frontalis* n = 10), foi confeccionada 1 lâmina da porção mediana do intestino médio, contendo 3 secções histológicas, para a caracterização histoquímica, utilizando-se os corantes Sudan Black para visualização de lipídios neutros (Pearse, 1960), Xylidine Ponceau para proteínas totais (Vidal, 1970), e a técnica Ácido Periódico e Reativo de Schiff (PAS) com Azul de Bromofenol para a detecção de glicoconjugados neutros (glicoproteínas, carboidratos e polissacarídeos neutros) e proteínas totais, respectivamente (Coelho, 1989). As secções coradas foram analisadas ao microscópio óptico de campo claro (Olympus SC30) e fotodocumentação (Software Olympus cellSens Entry 1.14)

### 3.2.6 Caracterização Ultraestrutural

Uma parte da porção mediana do intestino médio de algumas abelhas (*X. suspecta* n = 3; *X. frontalis* n = 2) também foi utilizada para a caracterização ultraestrutural. Para isso, os fragmentos obtidos foram fixados em Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3), durante 24 horas à temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. Em seguida, foram contrastadas em acetato de uranila a 0,5% durante 2 horas, gradualmente desidratadas em acetona (50%, 70%, 90% e 100%) e, finalmente, incluídas em resina Araldite. Secções ultrafinas foram cortadas em um ultramicrotomo, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 15 minutos e, então, analisadas e fotografadas com um microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit (FEI Company, Eindhoven, Holanda) no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* Botucatu.

### 3.2.7 Plantas Utilizadas na Alimentação das Abelhas

Para conhecimento das plantas utilizadas na alimentação das abelhas das espécies *X. suspecta* (n = 1) e *X. frontalis* (n = 10), foram identificados os grãos de pólen presentes no lúmen da porção mediana do intestino médio dessas abelhas. Para isso, foi selecionada 1 lâmina por indivíduo, corada com HE, e as regiões com pólen foram fotografadas aleatoriamente.

A identificação dos grãos de pólen foi realizada em níveis de família, gênero e espécie pela Dr. Cláudia Inês da Silva.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Caracterização Histológica

Tanto em *X. suspecta* quanto em *X. frontalis*, o intestino médio, em todas as suas porções, é um tubo alongado com dobras transversais em sua parede, encontrado ocupando grande parte da cavidade abdominal. No lúmen, pode ser observada a matriz peritrófica envolvendo o alimento (figura 2).

Em ambas as espécies de abelhas aqui estudadas, as três porções do intestino médio são constituídas por um epitélio colunar simples, o qual repousa sobre uma lâmina basal acidófila e é contornado externamente por fibras musculares, não possuindo diferenças morfológicas (figuras 3, 4 e 5).

As fibras musculares contornam o intestino médio de forma circular e longitudinalmente. As fibras circulares são menores em relação às longitudinais, sendo encontradas mais próximas à lâmina basal. As fibras longitudinais formam uma camada acima das fibras circulares (figuras 3, 4 – A e 5).

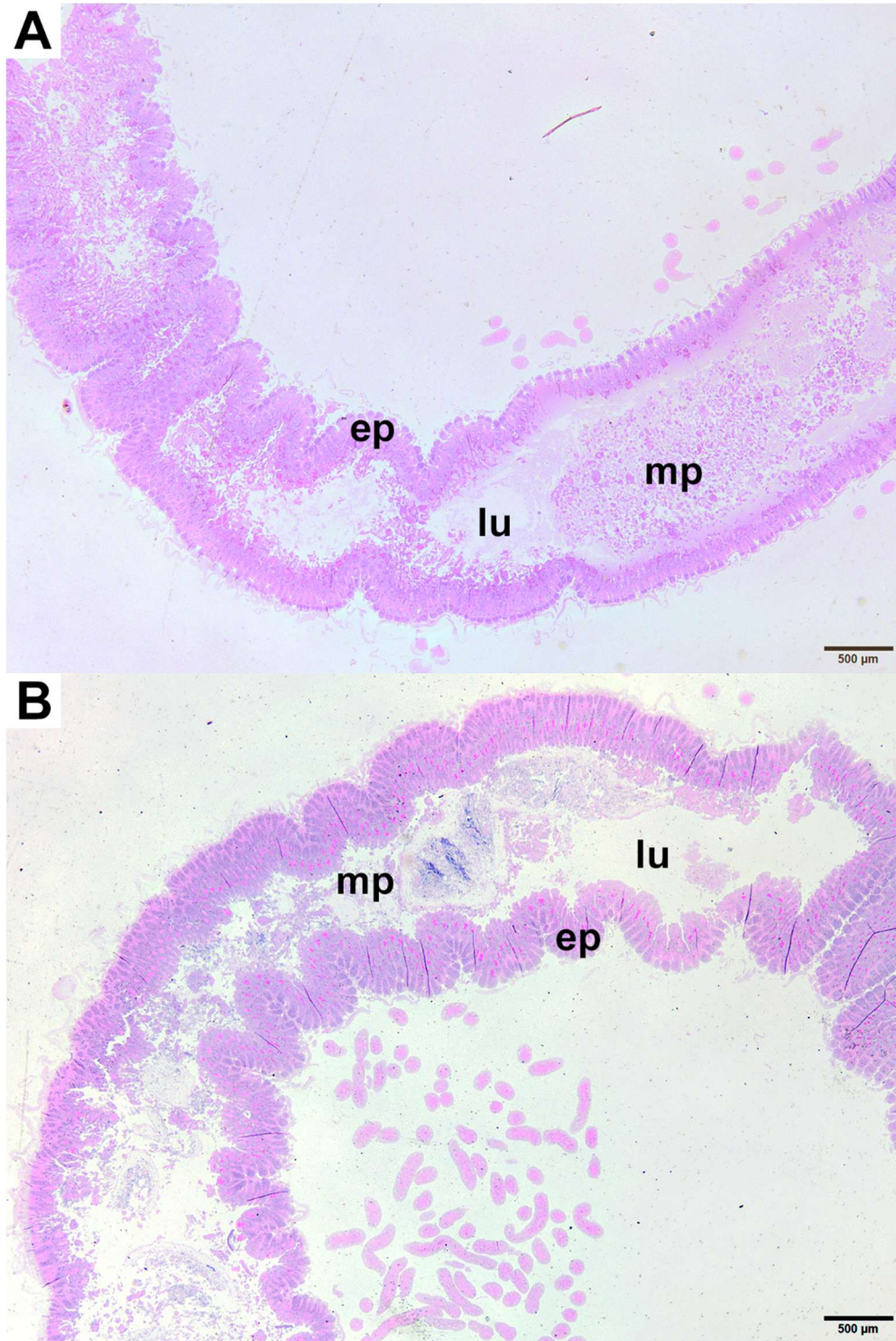
Foram identificados dois tipos celulares no epitélio intestinal das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*: as células regenerativas, estando agrupadas em ninhos, e as células digestivas (figuras 3 – B e 5 – A).

O ninho de células regenerativas é uma estrutura arredondada basófila, na qual as células estão agrupadas de forma concêntrica. No centro do ninho, as células são pequenas e esféricas, tornando-se maiores e mais achatadas na periferia da estrutura. O núcleo das células regenerativas é grande, central e varia de esférico a achatado. As células regenerativas mais periféricas saem do ninho e formam camadas acima dele, diferenciando-se em direção ao lúmen do intestino médio. Essas células digestivas recém-saídas do ninho são arredondadas, com citoplasma basófilo, núcleo grande, esférico e central.

Durante o processo de diferenciação, as células digestivas mudam gradualmente para o formato colunar. Também, há a formação da borda em escova, o que resulta no surgimento de uma cavidade entre as células para dar espaço à nova estrutura. Essa cavidade é fortemente corada pela eosina (figura 4 – B). Conforme as células avançam no processo de diferenciação, há o alongamento da borda em escova e, conseqüentemente, da cavidade entre as células. A cavidade entre as células aumenta até que a borda em escova se volta totalmente para o lúmen do intestino médio (figura 6). O citoplasma das células digestivas é acidófilo; o núcleo é grande, esférico e central. A borda em escova é acidófila.

Figura 2 – Secções longitudinais do intestino médio de *X. suspecta* e *X. frontalis*, vistas ao microscópio óptico. Coloração: HE. A) *X. suspecta*. B) *X. frontalis*. Magnificações: 20x.

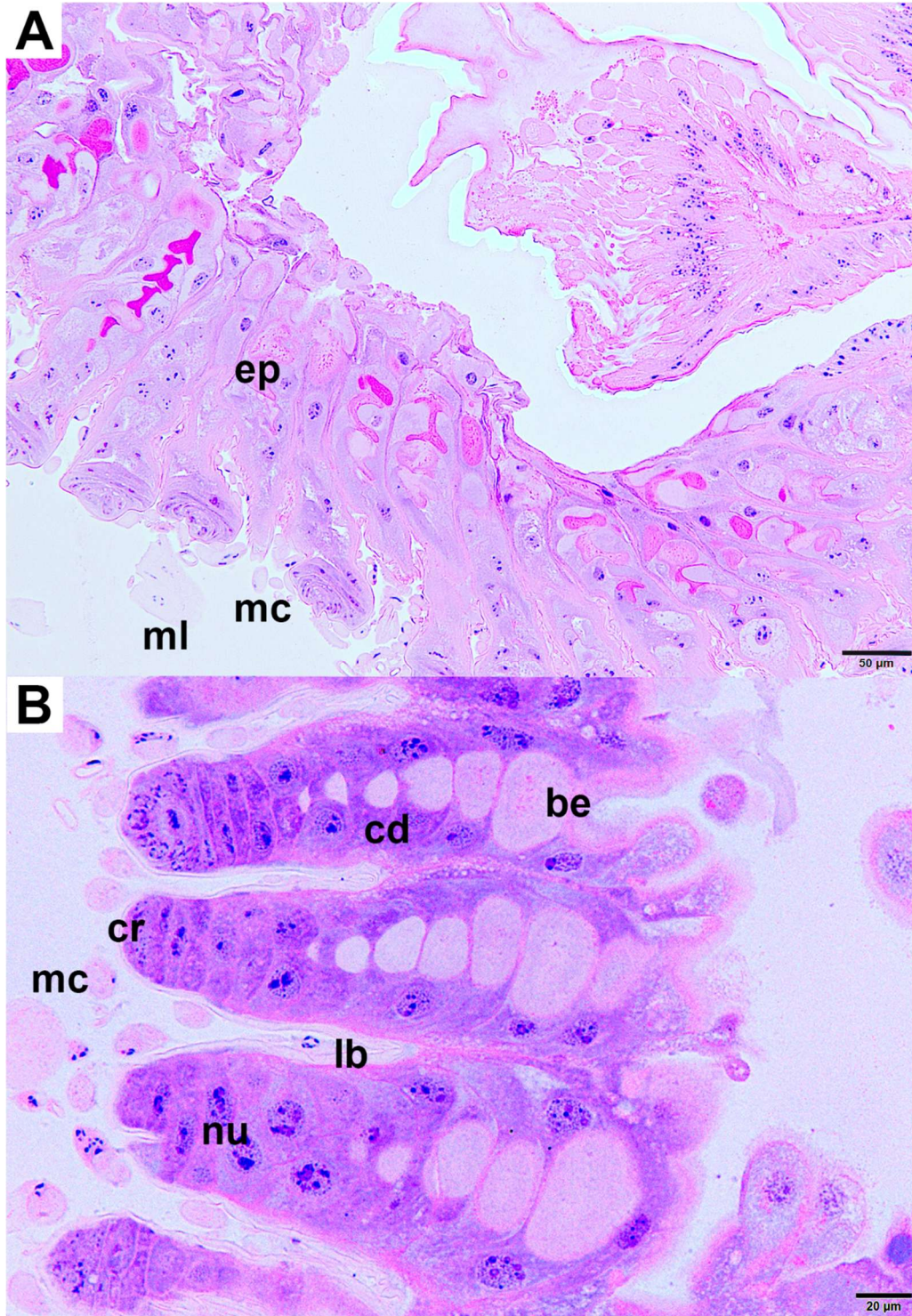
Escalas: 500  $\mu$ m.



Fonte: elaborado pela autora.

ep: epitélio; lu: lúmen; mp: matriz peritrófica.

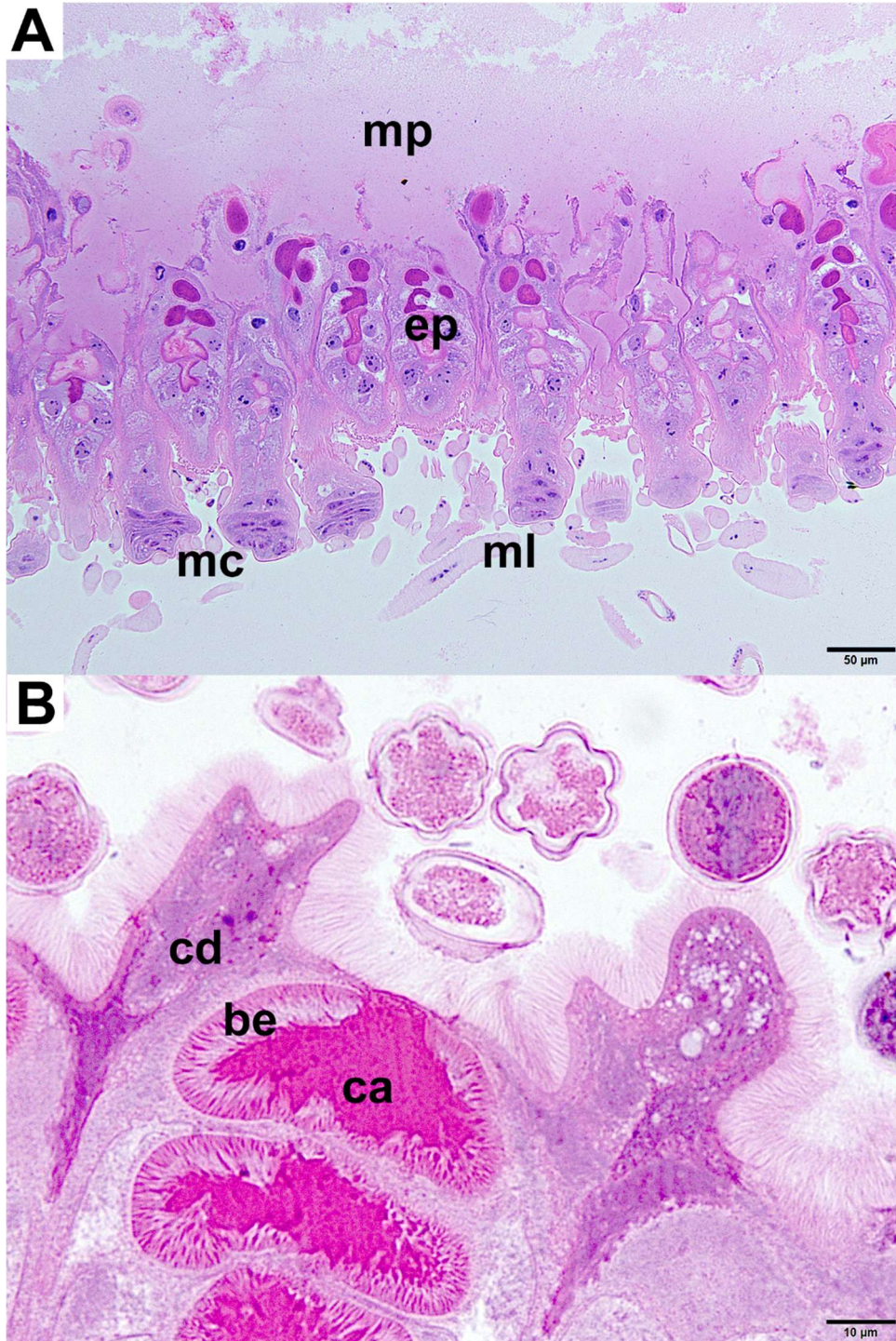
Figura 3 – Secções longitudinais da porção anterior do intestino médio de *X. suspecta* e *X. frontalis*, vistas ao microscópio óptico. Coloração: HE. A) Porção anterior do intestino médio da espécie *X. suspecta*. Magnificação: 200x. Escala: 50 µm. B) Epitélio da porção anterior do intestino médio da espécie *X. frontalis*. Magnificação: 400x. Escala: 20 µm.



Fonte: elaborado pela autora.

ep: epitélio; ml: músculo longitudinal; mc: músculo circular; lb: lâmina basal; cr: células regenerativas; cd: células digestivas; be: borda em escova; nu: núcleo.

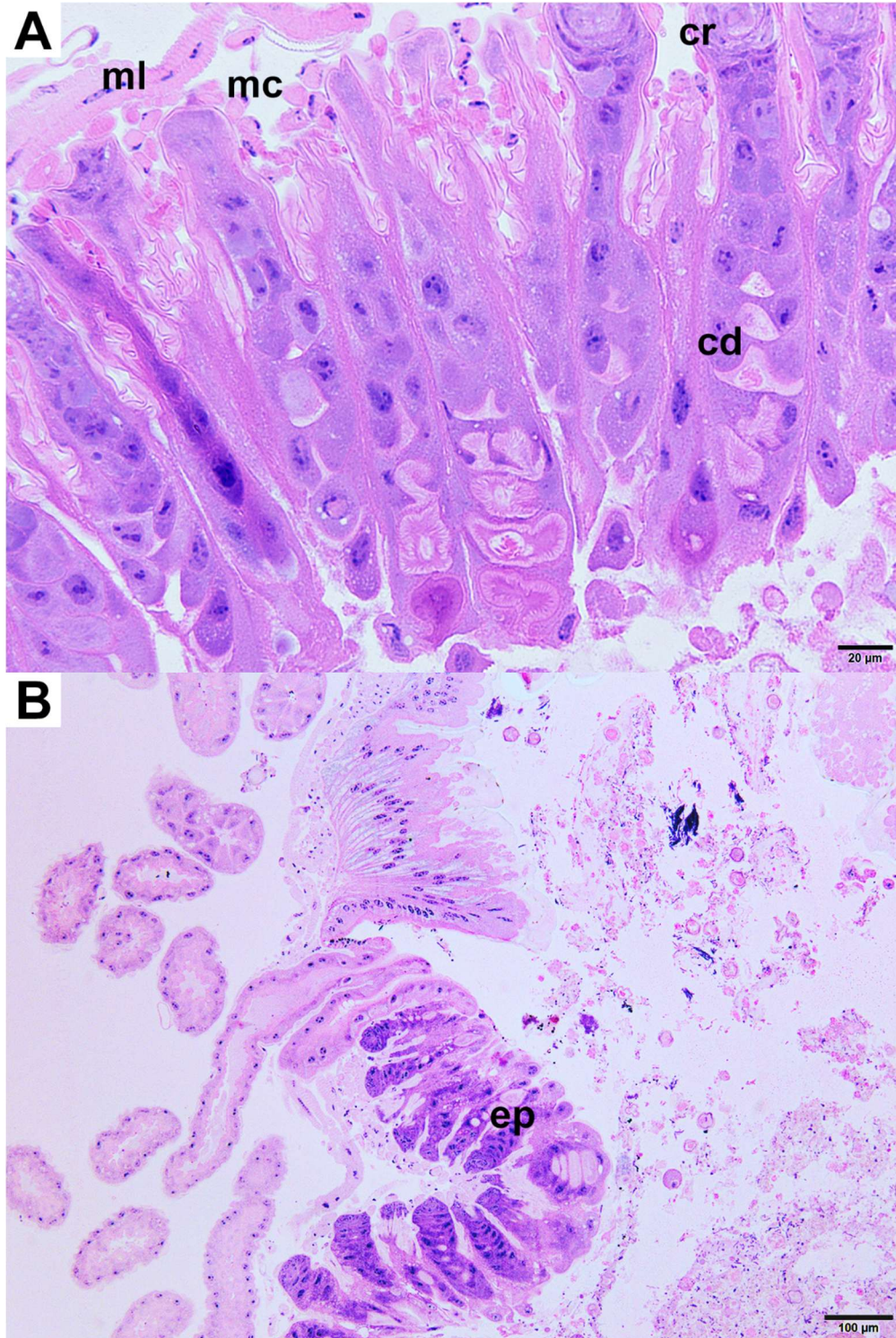
Figura 4 – Secções longitudinais da porção mediana do intestino médio de *X. suspecta* e *X. frontalis*, vistas ao microscópio óptico. Coloração: HE. A) Epitélio intestinal da espécie *X. suspecta*. Magnificação: 200x. Escala: 50 µm. B) Células digestivas da porção mediana da espécie *X. frontalis*. Magnificação: 1000x. Escala: 10 µm.



Fonte: elaborado pela autora.

ep: epitélio; ml: músculo longitudinal; mc: músculo circular; lb: lâmina basal; cd: células digestivas; mp: matriz peritrófica, ca: cavidade.

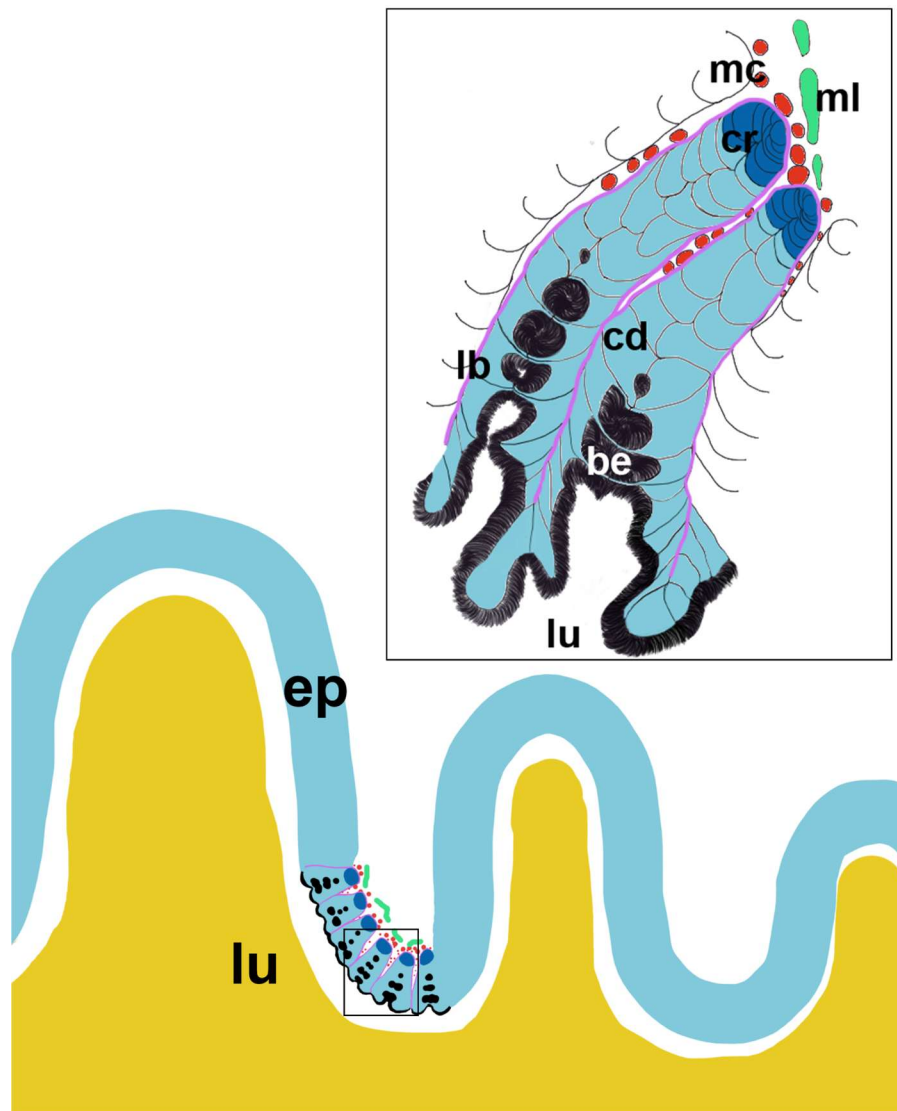
Figura 5 – Secções longitudinais da porção posterior do intestino médio de *X. suspecta* e *X. frontalis*, vistas ao microscópio óptico. Coloração: HE. A) Epitélio intestinal da espécie *X. suspecta*. Magnificação: 400x. Escala: 20  $\mu$ m. B) Transição entre os epitélios dos intestinos médio e posterior da espécie *X. frontalis*. Magnificação: 100x. Escala: 100  $\mu$ m.



Fonte: elaborado pela autora.

ep: epitélio; ml: músculo longitudinal; mc: músculo circular; cr: células regenerativas; cd: células digestivas.

Figura 6 – Esquema representativo de um fragmento da porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*. O órgão tem formato cilíndrico e possui lúmen. Em sua parede há dobras que, quando ampliadas ao microscópio óptico, revelam-se formadas por células epiteliais, estando estas apoiadas em uma lâmina basal e contornadas pelas musculaturas circular e longitudinal. As células epiteliais organizam-se de acordo com seu desenvolvimento. As células digestivas voltadas para o lúmen formam vilosidades com as células das criptas adjacentes.



Fonte: elaborado pela autora.

ep: epitélio; cd: células digestivas; cr: células regenerativas; lb: lâmina basal; be: borda em escova; ml: músculo longitudinal; mc: músculo circular; lu: lúmen.

### 3.3.2 Caracterização histoquímica

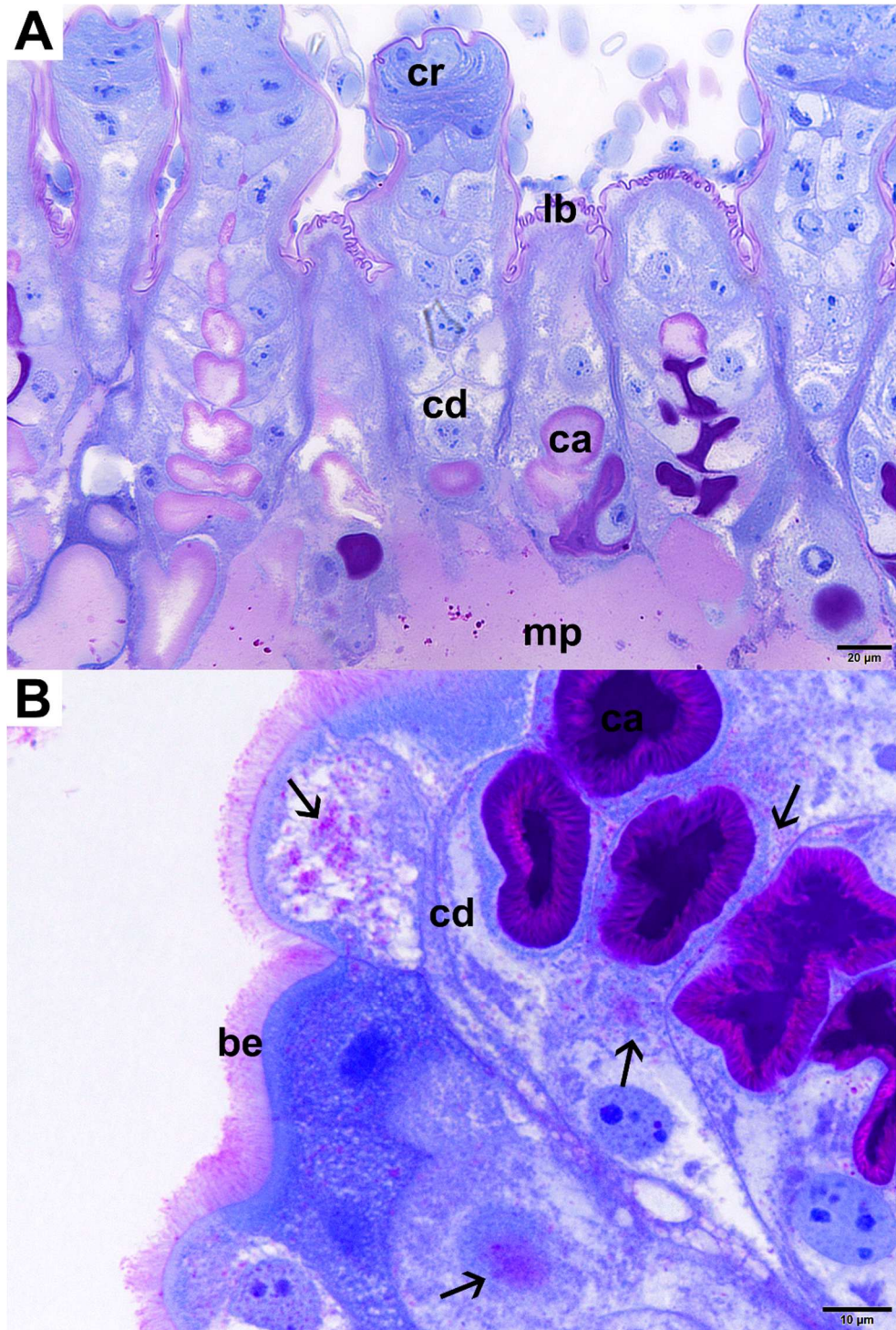
A caracterização histoquímica da porção mediana do epitélio do intestino médio das espécies de abelhas *X. suspecta* e *X. frontalis* foi realizada por meio de reagentes ou corantes específicos para a identificação de proteínas, carboidratos e lipídios.

Em ambas as espécies de abelhas, o PAS – o qual reage na presença de carboidratos – foi positivo na borda em escova das células digestivas e nas cavidades entre elas. No citoplasma das células digestivas, glicoconjugados neutros foram observados, principalmente abaixo da borda em escova. Nas células digestivas sem borda em escova, a reação positiva foi rara. Na lâmina basal e na matriz peritrófica, a reação do PAS foi positiva (figura 7).

Quanto à presença de proteínas nas células epiteliais da porção mediana do intestino médio das abelhas, tanto o Azul de Bromofenol – o qual foi conjugado com o PAS – quanto o Xylidine Ponceau coraram as cavidades e o citoplasma das células digestivas, assim como das células dos ninhos. Xylidine Ponceau também indicou a presença de proteínas na borda em escova, na lâmina basal e na matriz peritrófica (figuras 7 e 8).

Em relação à presença de lipídios, em ambas as espécies de abelhas, depósitos no citoplasma das células digestivas foram revelados por meio do corante Sudan Black, sendo raros nas células digestivas sem borda em escova (figura 9).

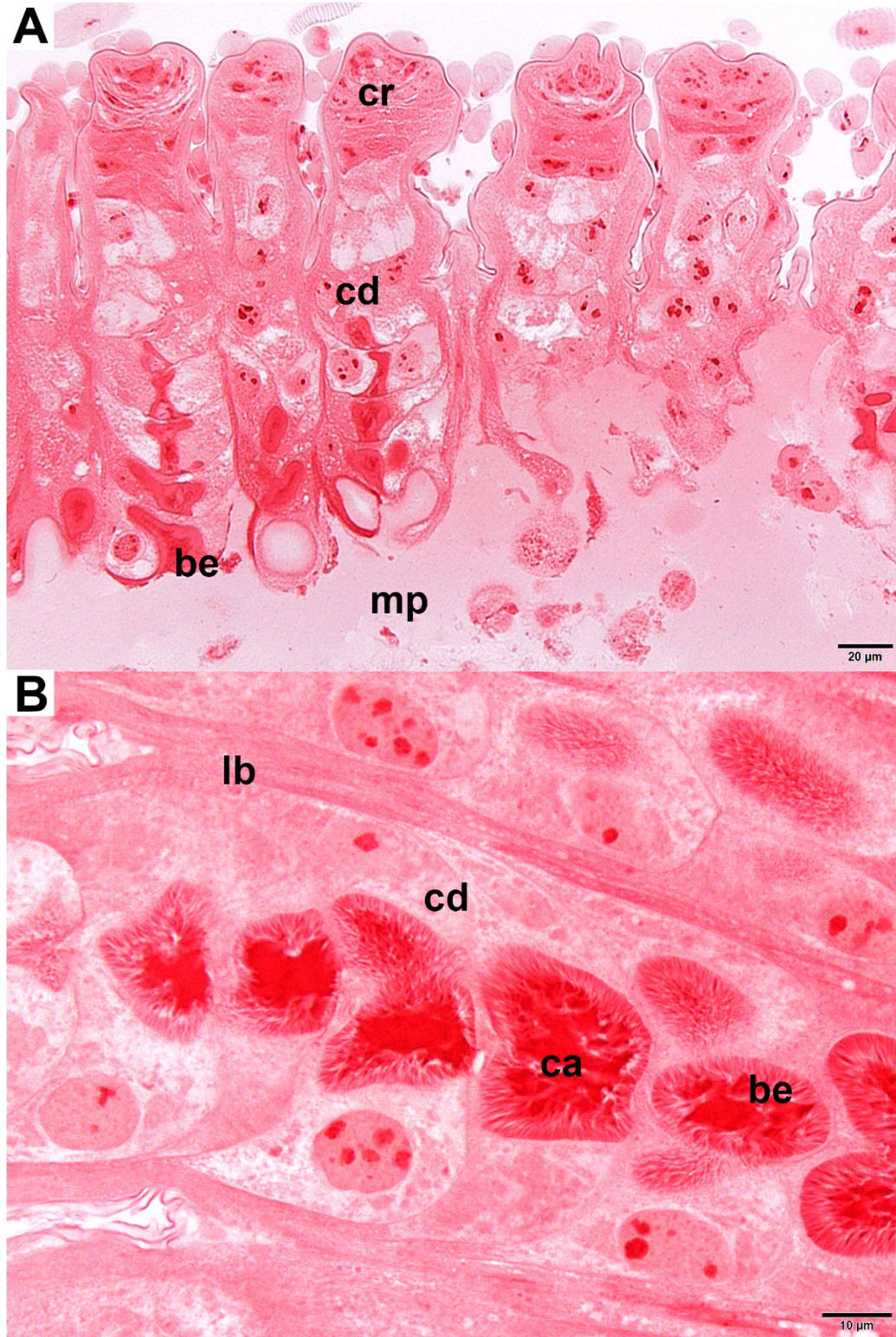
Figura 7 – Secções longitudinais da porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*, vistas ao microscópio óptico. Coloração: PAS e Azul de Bromofenol. A) Epitélio da espécie *X. suspecta*. Magnificação: 400x. Escala: 20 µm. B) Células digestivas de *X. frontalis*. Magnificação: 1000x. Escala: 10 µm.



Fonte: elaborado pela autora.

cr: células regenerativas; cd: células digestivas; ca: cavidade; be: borda em escova; mp: matriz peritrófica; lb: lâmina basal; seta: glicoconjugados neutros.

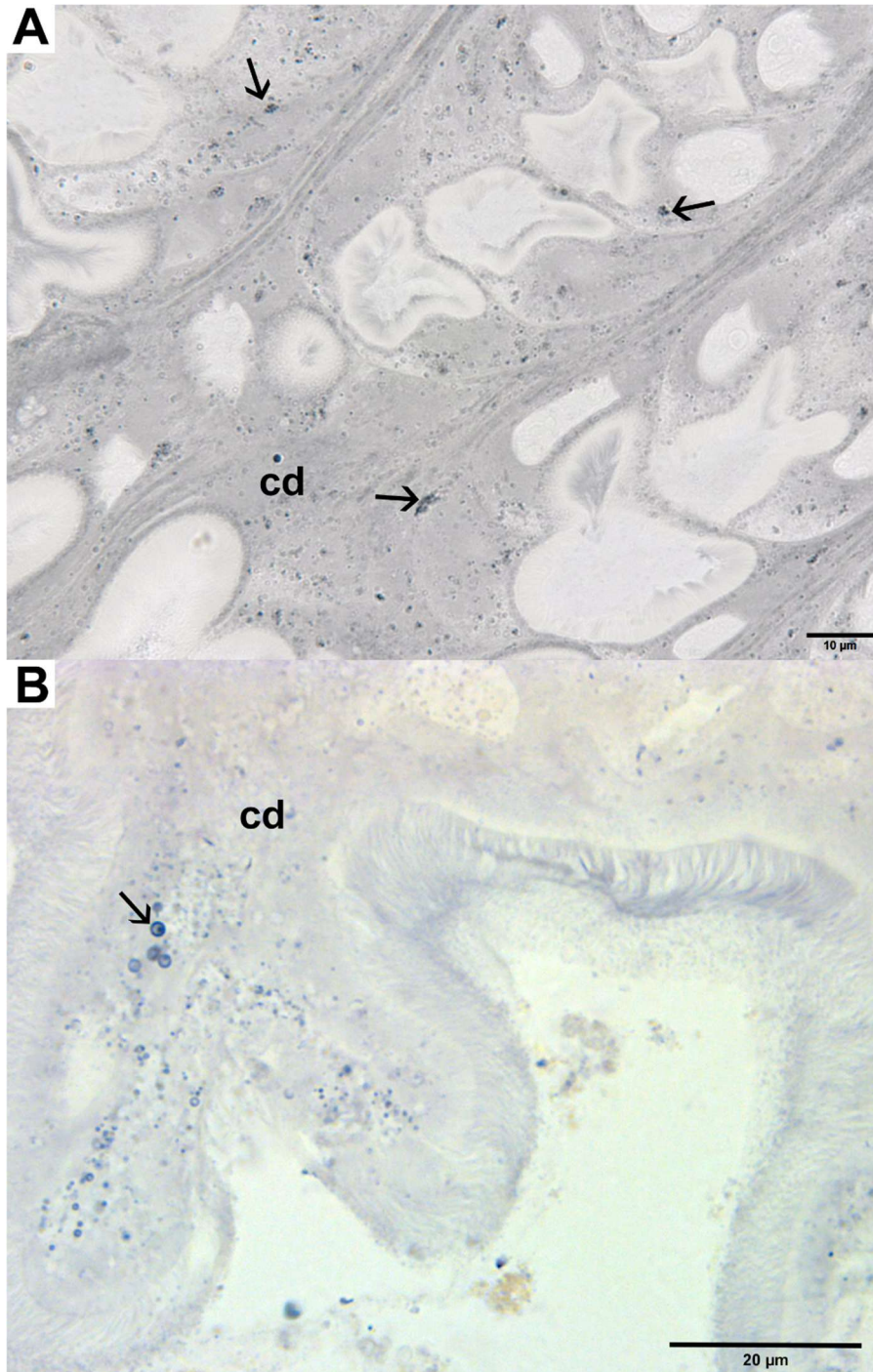
Figura 8 – Secções longitudinais da porção mediana do intestino médio de *X. suspecta* e *X. frontalis*, vistas ao microscópio óptico. Coloração: Xylidine Ponceau. A) Epitélio da espécie *X. suspecta*. Magnificação: 400x. Escala: 20  $\mu\text{m}$ . B) Epitélio da espécie *X. frontalis*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .



Fonte: elaborado pela autora.

cr: células regenerativas; cd: células digestivas; mp: matriz peritrófica; be: borda em escova; lb: lâmina basal.

Figura 9 – Secções longitudinais da porção mediana do intestino médio de *X. suspecta* e *X. frontalis*, vistas ao microscópio óptico. Coloração: Sudan Black. A) Células digestivas da espécie *X. suspecta*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu$ m. B) Células digestivas da espécie *X. frontalis*. Magnificação: 1000x. Escala: 20  $\mu$ m.



Fonte: elaborado pela autora.

cd: células digestivas; seta: depósitos lipídicos.

### 3.3.3 Caracterização Ultraestrutural

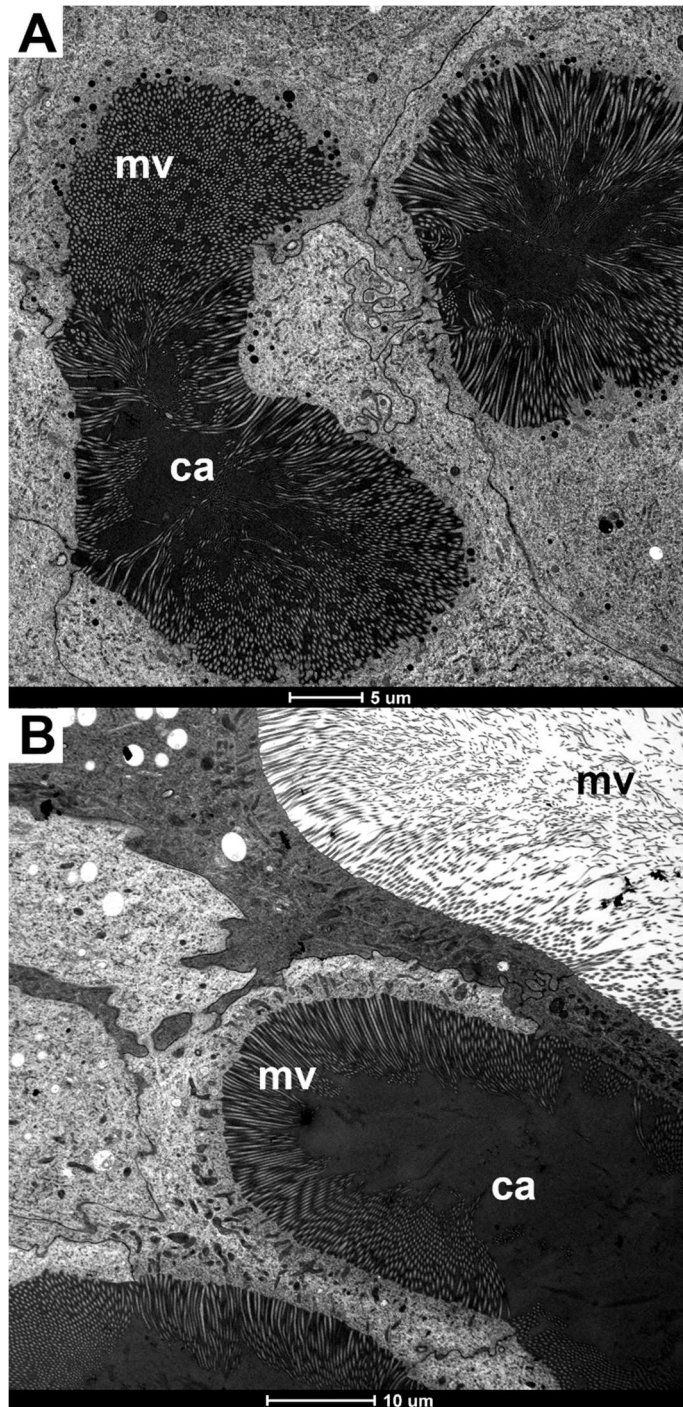
As características ultraestruturais das células epiteliais constituintes da porção mediana do intestino médio das espécies *X. frontalis* e *X. suspecta*, observadas por meio do microscópio eletrônico de transmissão (MET), mostraram-se semelhantes.

As células digestivas podem apresentar citoplasmas com diferentes eletrodensidades, dependendo da abundância de organelas presentes (figura 10 – B). Elas também podem ou não possuir microvilosidades, de acordo com seu grau de diferenciação.

As células com microvilosidades podem ter suas microvilosidades projetadas para o interior de cavidades preenchidas com um conteúdo eletrodense, ou para o lúmen do intestino médio (figura 10).

No citoplasma apical das células digestivas com microvilosidades, as mitocôndrias concentram-se abaixo da membrana plasmática. Entre elas, podem haver vacúolos eletrodensos, cisternas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso, autofagossomos e depósitos lipídicos (figura 11), assim como cisternas do retículo endoplasmático liso e vacúolos eletrolucentes.

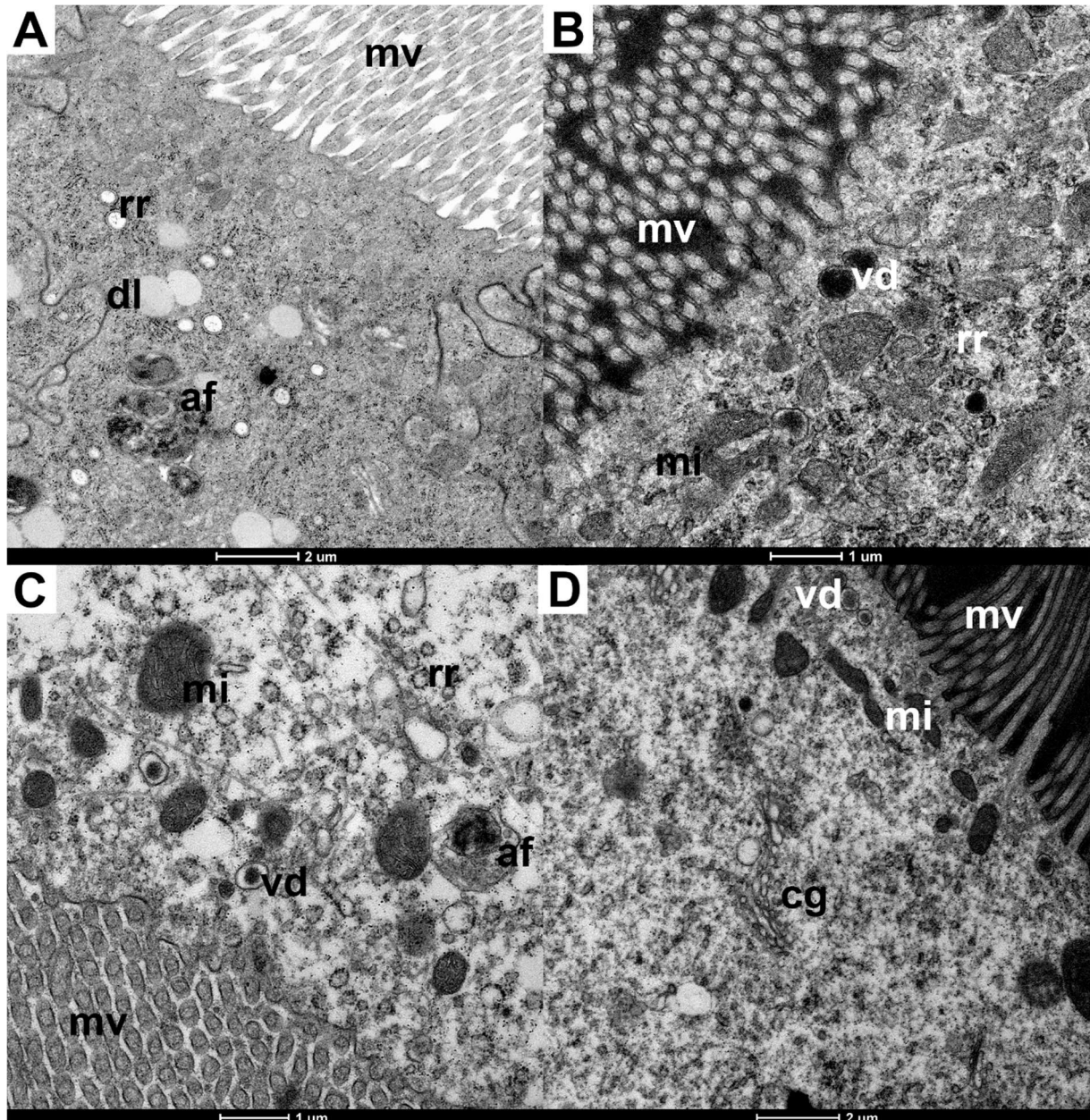
Figura 10 – Secções longitudinais das células digestivas da porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*, observadas por meio do MET. A) Células digestivas da espécie *X. suspecta* com as microvilosidades projetadas para o interior das cavidades. B) Células digestivas da espécie *X. frontalis* com as microvilosidades projetadas para o interior das cavidades e para o lúmen do órgão, apresentando diferentes eletrodensidades em seus citoplasmas.



Fonte: elaborado pela autora.

mv: microvilosidades; ca: cavidade.

Figura 11 – Secções longitudinais do citoplasma apical das células digestivas da porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*, observadas por meio do MET. A) Célula digestiva de *X. suspecta* com as microvilosidades projetadas para o lúmen do órgão. B) Célula digestiva de *X. suspecta* com as microvilosidades projetadas para a cavidade. C) Célula digestiva de *X. frontalis* com as microvilosidades projetadas para o lúmen do órgão. D) Célula digestiva de *X. frontalis* com as microvilosidades projetadas para a cavidade.



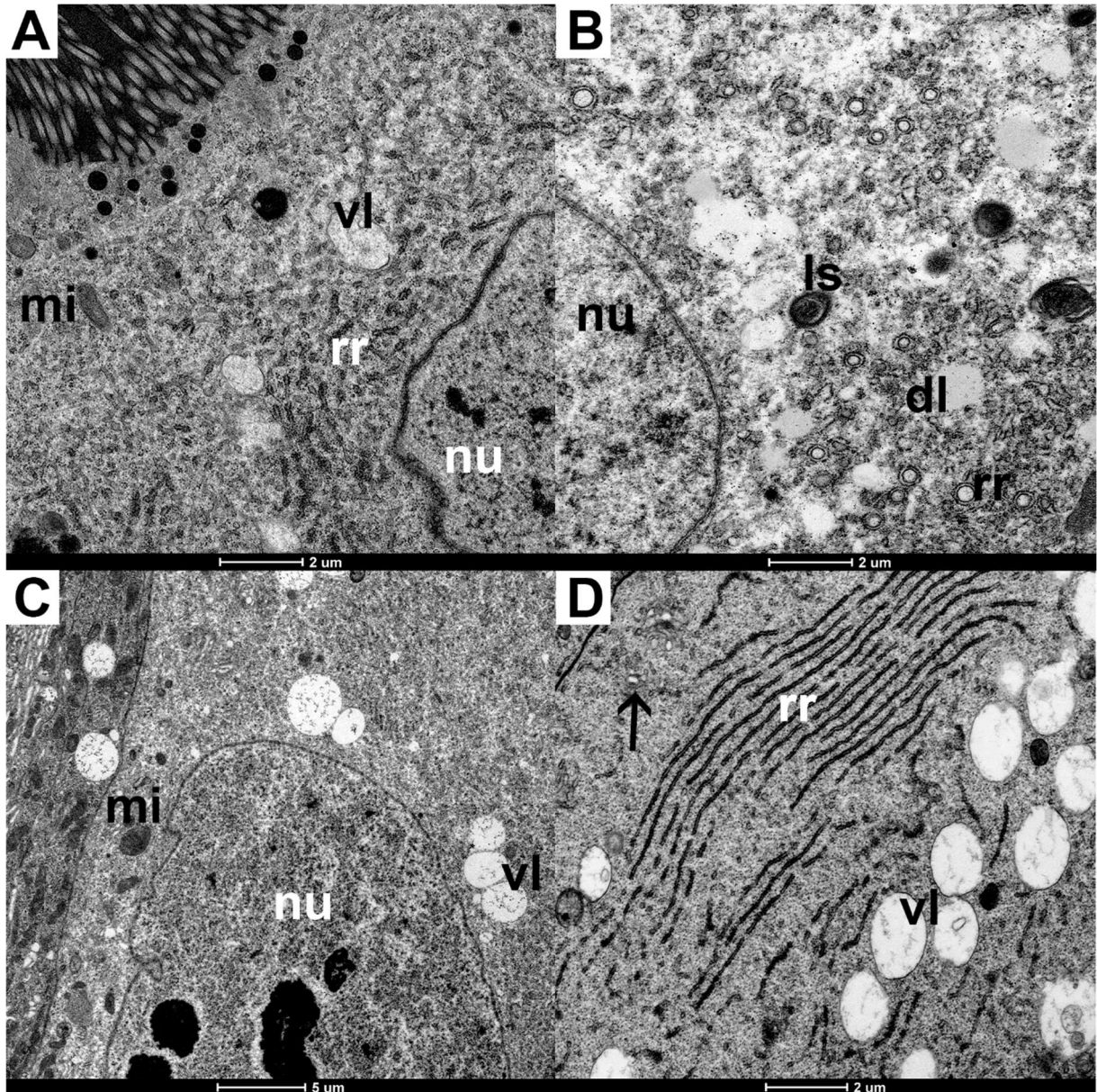
Fonte: elaborado pela autora.

mv: microvilosidades; mi: mitocôndria; dl: depósitos lipídicos; vd: vacúolo com material eletrodense; af: autofagossomos; rr: retículo endoplasmático rugoso; cg: complexo de Golgi.

Nas áreas citoplasmáticas perinucleares das células digestivas com microvilosidades, há numerosas cisternas dos retículos endoplasmático liso e rugoso, vacúolos contendo material eletrolucente e cisternas do complexo de Golgi. Autofagossomos, vacúolos eletrodensos, depósitos lipídicos, lisossomos e mitocôndrias foram vistos com menor frequência. No núcleo, a cromatina é descondensada em sua maior parte (figura 12).

O citoplasma basal das células digestivas com microvilosidades é ocupado por inúmeras dobras da membrana, formando o labirinto basal. Entre o labirinto, são encontradas muitas mitocôndrias e cisternas do retículo endoplasmático rugoso (figura 13). Vacúolos contendo material eletrolucente, autofagossomos, cisternas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático liso também foram vistos.

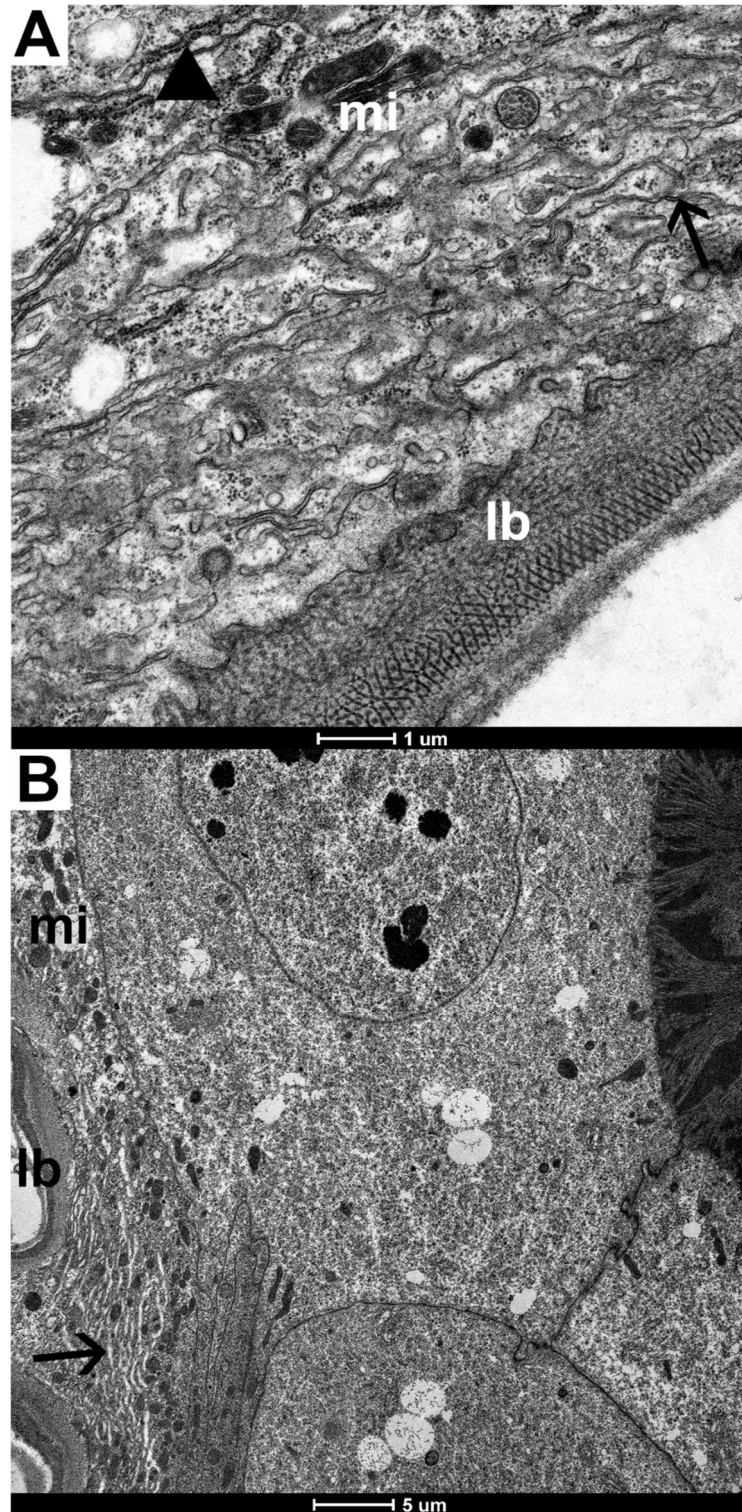
Figura 12 – Secções longitudinais do citoplasma perinuclear das células digestivas da porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*, observadas por meio do MET. A) Célula da espécie *X. suspecta* com microvilosidades projetadas para a cavidade. B) Citoplasma da célula da espécie *X. suspecta*. C) Citoplasma da célula da espécie *X. frontalis*. D) Citoplasma da célula da espécie *X. frontalis*.



Fonte: elaborado pela autora.

mi: mitocôndria; vd: vacúolo com material eletrodense; vl: vacúolo contendo material eletrolucente; ls: lisossomo; dl: depósitos lipídicos; seta: complexo de Golgi; rr: retículo endoplasmático rugoso; nu: núcleo.

Figura 13 – Secções longitudinais do citoplasma basal das células digestivas da porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*, observadas por meio do MET. A) Citoplasma basal da célula digestiva da espécie *X. suspecta*. B) Citoplasma basal da célula digestiva da espécie *X. frontalis*.



Fonte: elaborado pela autora.

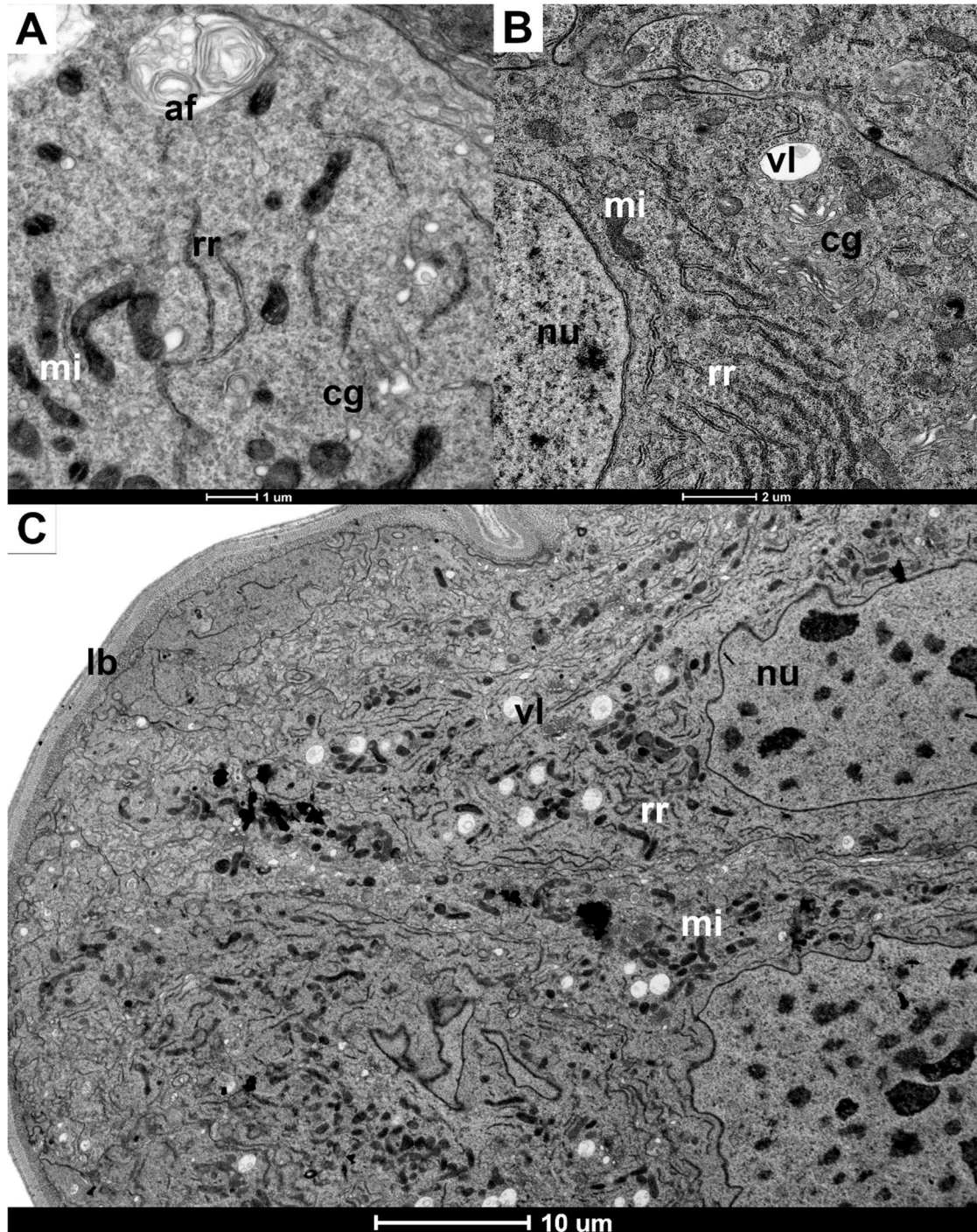
lb: lâmina basal; seta: labirinto basal; mi: mitocôndria; cabeça-de-seta: retículo endoplasmático rugoso.

As células digestivas sem microvilosidades contêm mitocôndrias, complexo de Golgi, longas cisternas do retículo endoplasmático rugoso, vacúolos contendo material eletrolucente e alguns autofagossomos espalhados pelo citoplasma. Na região basal, há o labirinto basal associado a algumas mitocôndrias. O núcleo possui cromatina descondensada em sua maior parte (figura 14).

As células regenerativas, as quais estão organizadas em ninhos, possuem citoplasma com organelas em abundância, como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículo endoplasmático rugoso e autofagossomos. Os núcleos possuem cromatina com regiões condensadas e descondensadas. A região citoplasmática basal dessas células também contém dobras da membrana plasmática, formando os labirintos basais. Ainda, a musculatura pode ser observada sob a lâmina basal (figura 15).

A lâmina basal, encontrada sob as células epiteliais, é uma estrutura contínua, podendo apresentar ondulações e diferentes espessuras ao longo de seu comprimento. Ela é formada por uma matriz amorfa e é contornada por elementos que podem ser vistos longitudinalmente formando estrias, ou transversalmente, revelando estruturas poliédricas (figura 16).

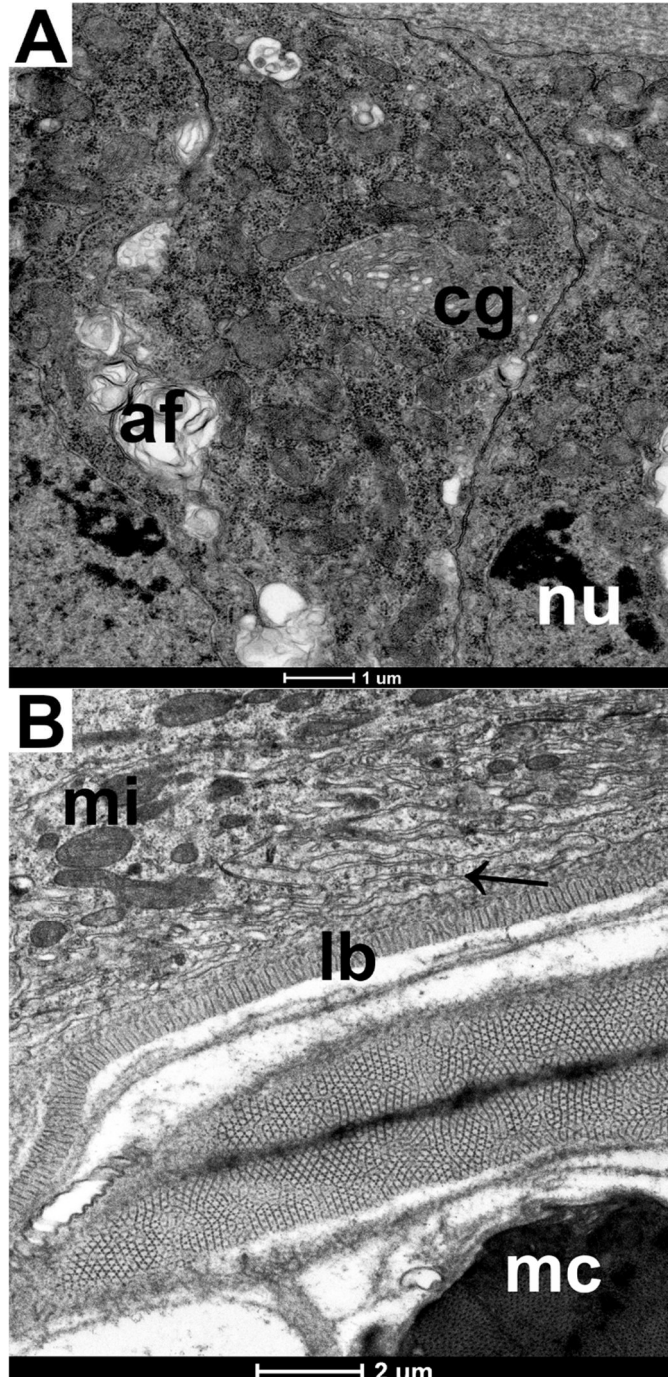
Figura 14 – Secções longitudinais do citoplasma das células digestivas imaturas da porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*, observadas por meio do MET. A) Citoplasma da célula da espécie *X. suspecta*. B) Célula da espécie *X. suspecta*. C) Citoplasma das células da espécie *X. frontalis*.



Fonte: elaborado pela autora.

mi: mitocôndria; vl: vacúolo contendo material eletrolucente; rr: retículo endoplasmático rugoso; cg: complexo de Golgi; af: autofagossomo.; nu: núcleo; lb: lâmina basal.

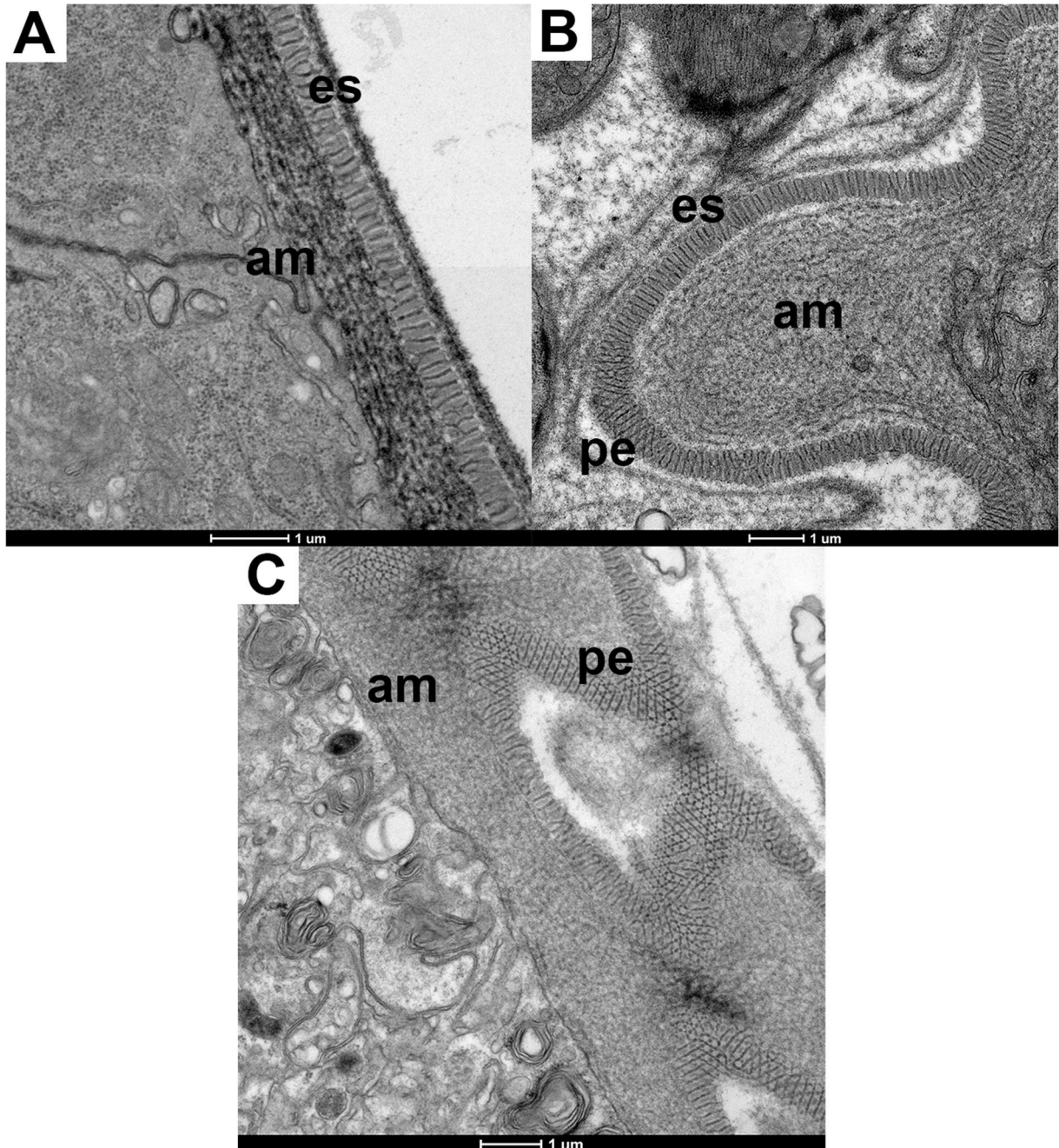
Figura 15 – Secções longitudinais do ninho de células regenerativas da porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*, observadas por meio do MET. A) Citoplasma de uma célula regenerativa da espécie *X. suspecta*. B) Labirinto basal presente em célula regenerativa da espécie *X. frontalis*.



Fonte: elaborado pela autora.

lb: lâmina basal; seta: labirinto basal; mi: mitocôndria; mc: músculo circular; nu: núcleo; af: autofagossomo; cg: complexo de Golgi; cr:

Figura 16 – Secções longitudinais da lâmina basal presente no epitélio da porção mediana do intestino médio da espécie *X. suspecta*, observadas por meio do MET. A) Lâmina basal com espessura fina. B) Lâmina basal possuindo ondulações e elementos da matriz posicionados transversal e longitudinalmente. C) Lâmina basal com ondulações e elementos da sua matriz seccionados transversalmente.



Fonte: elaborado pela autora.

es: estrias; pe: elemento poliédricos; am: matriz amorfa.

### 3.3.4 Plantas Utilizadas na Alimentação das Abelhas

Para conhecimento das plantas utilizadas pelas espécies *X. suspecta* e *X. frontalis* como fonte de alimento, foram identificados diversos grãos de pólen no lúmen da porção mediana do intestino médio das abelhas.

Foram identificadas 3 plantas a nível de gênero e 1 a nível de família no intestino médio de *X. suspecta*. No intestino médio de *X. frontalis*, foram identificadas 2 espécies, 9 gêneros e 3 famílias (quadro 1). Nas figuras 16 e 17, alguns grãos de pólen são mostrados. Contudo, em ambas as espécies, não foi possível identificar todos os grãos fotografados.

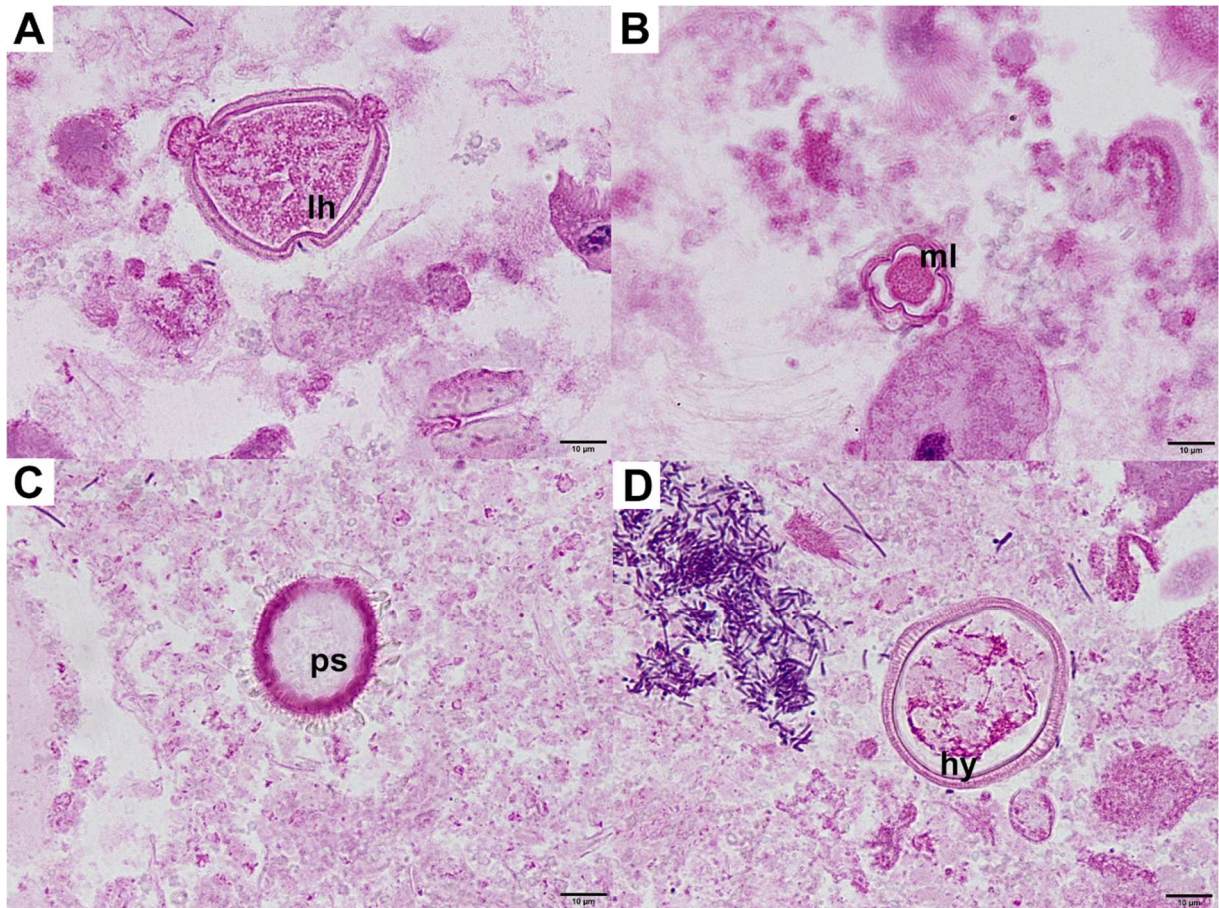
A maior parte dos grãos de pólen presentes no lúmen do intestino médio de ambas as espécies de abelhas apresentaram-se íntegros, porém alguns tinham seu conteúdo digerido, mas com o envoltório íntegro, ou extravasando do interior com o envoltório rompido ou não (figura 18).

Quadro 1 – Relação dos grãos de pólen identificados na porção mediana do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis*.

<i>X. suspecta</i>	<i>X. frontalis</i>
<i>Hyptis</i> sp.	Asteraceae
<i>Luehea</i> sp.	<i>Anadenanthera</i> sp.
Melastomataceae	<i>Borreria</i> sp.
<i>Passiflora</i> sp.	<i>Byrsonima</i> sp.
	<i>Cajanus cajan</i>
	<i>Chamaecrista</i> sp.
	<i>Cuphea</i> sp.
	<i>Hyptis</i> sp.
	Lamiaceae
	Melastomataceae
	<i>Ocimum</i> sp.
	<i>Passiflora</i> sp.
	<i>Senna</i> sp.
	<i>Trema micrantha</i>

Fonte: elaborado pela autora.

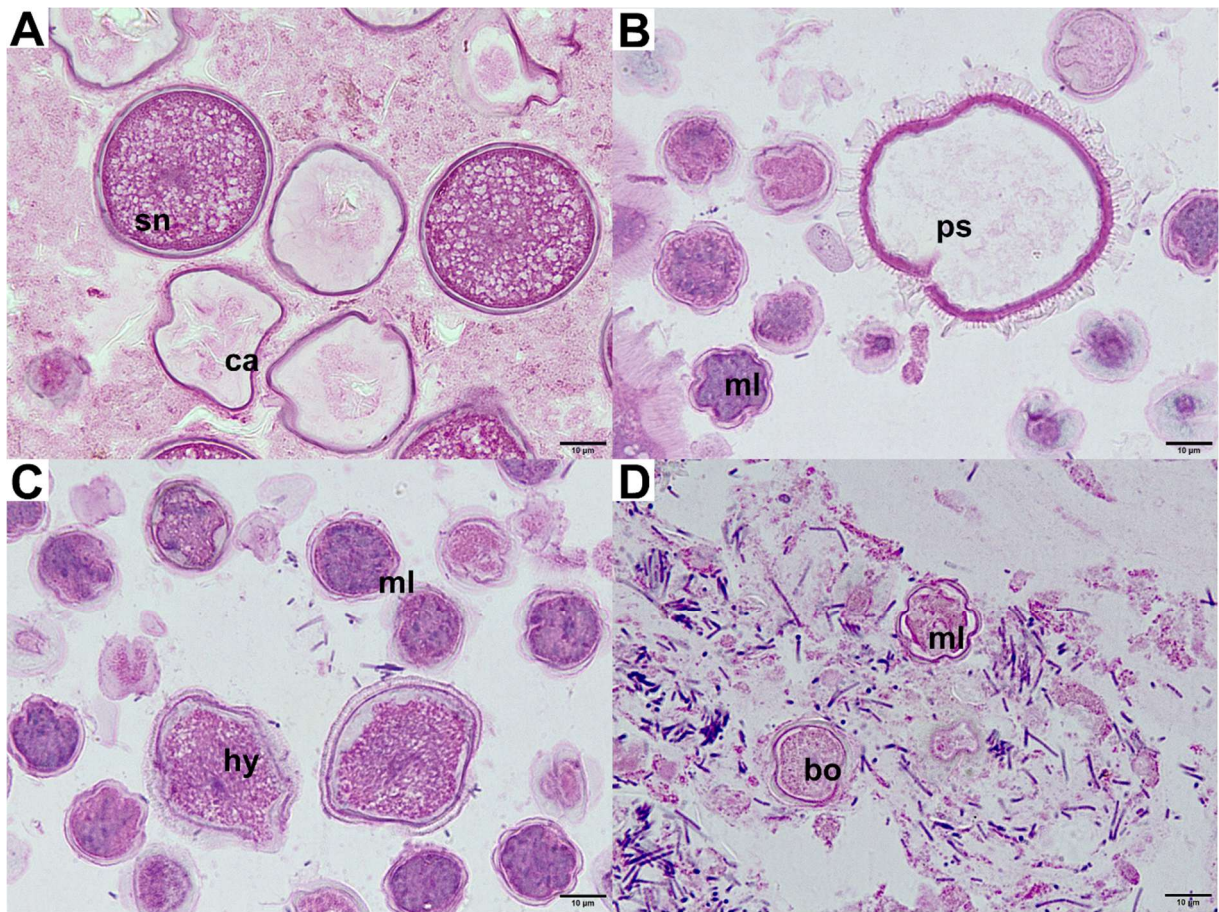
Figura 16 – Secções longitudinais do lúmen da porção mediana do intestino médio de *X. suspecta*, mostrando alguns grãos de pólen. Coloração: HE. A) Grão de pólen do gênero *Luehea*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu\text{m}$ . B) Grão de pólen da família Melastomataceae. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu\text{m}$ . C) Grão de pólen do gênero *Passiflora*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu\text{m}$ . D) Grão de pólen do gênero *Hyptis*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .



Fonte: elaborado pela autora.

lh: *Luehea* sp.; ml: Melastomataceae; ps: *Passiflora* sp.; hy: *Hyptis* sp.

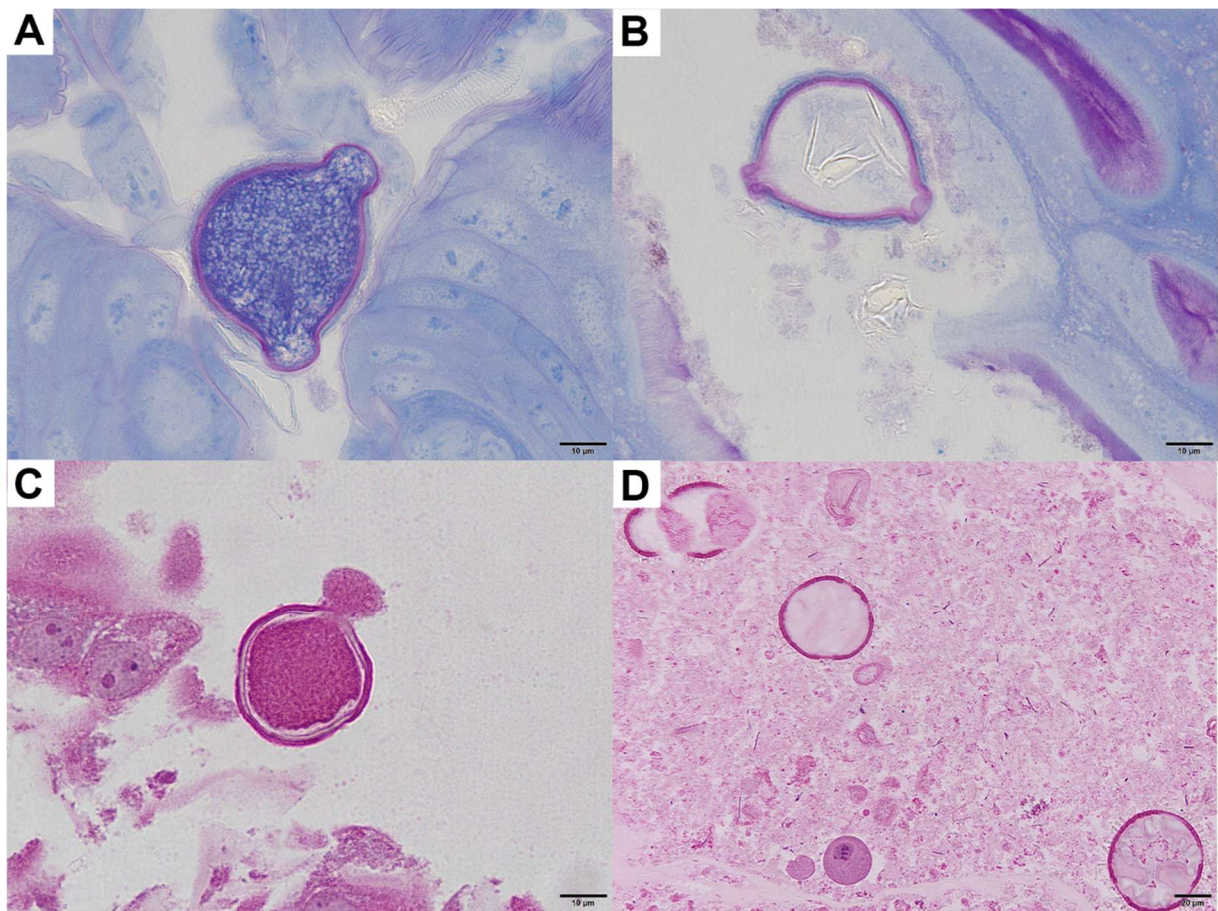
Figura 17 – Secções longitudinais do lúmen da porção mediana do intestino médio de *X. frontalis*, mostrando alguns grãos de pólen. Coloração: HE. A) Grãos de pólen do gênero *Senna* e da espécie *Cajanus cajan*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu$ m. B) Grãos de pólen da família Melastomataceae e do gênero *Passiflora*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu$ m. C) Grãos de pólen da família Melastomataceae e do gênero *Hyptis*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu$ m. D) Grãos de pólen da família Melastomataceae e do gênero *Borreria*. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu$ m.



Fonte: elaborado pela autora.

sn: *Senna* sp.; ca: *Cajanus cajan*; ml: Melastomataceae; ps: *Passiflora* sp.; hy: *Hyptis* sp.; bo: *Borreria* sp.

Figura 18 – Grãos de pólen presentes no lúmen das espécies *X. frontalis* e *X. suspecta*. A) Grão de pólen íntegro do gênero *Senna* presente no lúmen do intestino de *X. frontalis*. Coloração: PAS e azul de bromofenol. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu$ m. B) Grão de pólen do gênero *Senna* com conteúdo digerido presente no lúmen do intestino de *X. frontalis*. Coloração: PAS e azul de bromofenol. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu$ m. C) Grão de pólen do gênero *Borreria* com conteúdo extravasando do interior, presente no lúmen do intestino médio de *X. frontalis*. Coloração: HE. Magnificação: 1000x. Escala: 10  $\mu$ m. D) Grãos de pólen do gênero *Passiflora* íntegros e com o envoltório rompido. Coloração: HE. Magnificação: 400x. Escala: 20  $\mu$ m.



Fonte: elaborado pela autora.

### 3.4 DISCUSSÃO

As espécies de abelhas *X. suspecta* e *X. frontalis* apresentam características morfológicas, histoquímicas e ultraestruturais semelhantes no intestino médio.

O intestino médio das espécies de abelhas *X. suspecta* e *X. frontalis*, em todas as suas porções, é composto por um epitélio simples, formado essencialmente por células digestivas

colunares e ninhos de células regenerativas, apoiados em uma lâmina basal acidófila. Fibras musculares circulares e longitudinais são encontradas contornando externamente o epitélio. Na face interna, há a matriz peritrófica envolvendo o alimento.

O epitélio presente no intestino médio das abelhas estudadas até o momento também é do tipo colunar simples (Serrão e Cruz-Landim, 1996; Serrão *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2014; Domingues *et al.*, 2023; Tadei *et al.*, 2024), assim como nos demais insetos (Bution e Caetano, 2010; Gomes *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018; Miguel-Aliaga *et al.*, 2018; Bonelli *et al.*, 2019). Contudo, em algumas espécies de insetos, o epitélio intestinal pode ser de tipos diferentes, como é o caso de duas espécies de percevejo, *Cimex lectularius* e *Cimex pipistrelli*, as quais possuem a porção posterior do intestino médio formado por epitélio cuboidal simples (Rost-Roszkowska *et al.*, 2017); ou a espécie de crisopídeo *Ceraeochrysa claveri*, a qual possui epitélio colunar pseudoestratificado (Scudeler e Santos, 2014; Scudeler *et al.*, 2016; Scudeler *et al.*, 2022).

Além do tipo de epitélio, outras variações podem ocorrer no intestino médio dos demais insetos, como a presença de outros tipos celulares, como as células oxínticas observadas em moscas (Miguel-Aliaga *et al.*, 2018) e as *goblet cells* presentes em gafanhotos (Fathy e El-Rahman, 2023); a ausência de matriz peritrófica, como ocorre em muitas espécies de besouros, ou a ausência de células regenerativas, observada também em espécies de besouros, como *Stegobium paniceum* e *Neoclytus acuminatus* (Nardi e Bee, 2012) (quadro 2).

Quadro 2 – Características do epitélio do intestino médio de insetos de diversas ordens.

Referência	Inseto	Ordem	Espécie	Alimentação do adulto	Goblet cells	Oxyntic/copper/cuprophilic cells	Células regenerativas individuais (CRI)/Ninho de células regenerativas (NCR)/Bolsas regenerativas (BR)	Matriz peritrófica (MP)/Membrana perimicrovilar (MPM)	Tipo de epitélio
Miguel-Alaça <i>et al.</i> , 2018	Mosca	Diptera	Adultos de <i>Drosophila melanogaster</i>	Plantas em decomposição, fungos, leveduras e bactérias	N	S	CRI	MP	Colunar simples
Brown <i>et al.</i> , 1985	Mosquito	Diptera	Fêmeas de <i>Aedes aegypti</i>	Sangue	N	N	CRI	MP	Colunar simples
Endo e Nishitsutsuji-Uwo, 1981	Borboleta	Lepidoptera	Adultos de <i>Pieris rapae</i>	Néctar	N	N	CRI	NC	Colunar simples
Bution <i>et al.</i> , 2006	Formiga	Hymenoptera	Operárias de <i>Dolichoderus bispinosus</i>	Comida líquida (néctar, exsudato floral, líquidos extraídos de insetos)	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Bution e Caetano, 2010	Formiga	Hymenoptera	Adultos de <i>Cephalotes pusillus</i> , <i>Cephalotes clypeatus</i> e <i>Cephalotes atratus</i>		S	N	NCR	MP	Colunar simples
Raes e Verbeke, 1994	Abelha	Hymenoptera	Operárias de <i>Apis mellifera</i>	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Serrão e Cruz-Landim, 1996	Abelha	Hymenoptera	Adultos de <i>Scaptotrigona postica</i> (mandaguari), <i>Trigona spinipes</i> (Arapuá) e <i>Trigona hypogea</i> (abelha-abutre)	Pólen ( <i>S. postica</i> e <i>T. spinipes</i> ), organismos mortos ( <i>T. hypogea</i> )	N	N	NC	MP	Colunar simples
Gonçalves <i>et al.</i> , 2014	Abelha	Hymenoptera	Operárias de <i>Bombus morio</i>	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Serrão <i>et al.</i> , 2008	Abelha	Hymenoptera	Adultos de <i>Apis mellifera</i>	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples
			Adultos de <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> (mandacaia)	Néctar e pólen	N	N	NC	MP	Colunar simples
			Adultos de <i>Euglossa townsendi</i>	Néctar e pólen	N	N	NC	MP	Colunar simples
			Adultos de <i>Bombus morio</i>	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Carneiro <i>et al.</i> , 2018	Abelha	Hymenoptera	Operárias de <i>Apis mellifera</i> e <i>Melipona quadrifasciata</i>	Néctar e pólen	N	N	NC	MP	Colunar simples
Ceylan <i>et al.</i> , 2019	Abelha	Hymenoptera	Adultos de <i>Apis mellifera caucasia</i>	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Araújo <i>et al.</i> , 2019; Farder-Gomes <i>et al.</i> , 2021	Abelha	Hymenoptera	Operárias de <i>Partamona helleri</i> (boca-de-sapo)	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Oliveira <i>et al.</i> , 2019	Abelha	Hymenoptera	Operárias de <i>Friesella schrottkyi</i> (mirim-preguiça)	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Moreira <i>et al.</i> , 2022	Abelha	Hymenoptera	Operárias de <i>Apis mellifera</i>	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Tadei <i>et al.</i> , 2024	Abelha	Hymenoptera	<i>Centris analis</i>	Néctar e pólen	N	N	NCR	MP	Colunar simples

Referência	Inseto	Ordem	Espécie	Alimentação do adulto	Goblet cells	Oxyntic/copper/cuprophilic cells	Células regenerativas individuais (CRI)/Ninho de células regenerativas (NCR)/Bolsas regenerativas (BR)	Matriz peritrófica (MP)/Membrana perimicrovilar (MPM)	Tipo de epitélio
Nardi e Bee, 2012	Besouro	Coleoptera	<i>Harpalus pennsylvanicus</i>		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Haliphus</i> sp.		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Tropisternus lateralis</i>		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Ataenius</i> sp.		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Cotinus nitida</i>		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Carpophilus freemani</i>		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Megalodacne fasciata</i>	Fungos	N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Coccinellus septempunctata</i>		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Stegobium paniceum</i>	N	N	N	N	N	Colunar simples
			<i>Tenebrio molitor</i>	Farinha de trigo	N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Alphitobius diaperinus</i>		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Diaperis maculata</i>	Fungos	N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Neoclytus acuminatus</i>	N	N	N	N	N	Colunar simples
			<i>Megacyllene caryae</i>		N	N	BR	N	Colunar simples
			<i>Diabrotica virgifera</i>		N	N	BR	MP	Colunar simples
<i>Charidotella sexpunctata</i>		N	N	BR	MP	Colunar simples			
<i>Callosobruchus maculatus</i>	N	N	N	BR	N	Colunar simples			
<i>Ips pini</i>		N	N	BR	N	Colunar simples			
Nardi <i>et al.</i> , 2010	Besouro	Coleoptera	Todas as fases de desenvolvimento de <i>Tenebrio molitor</i>	Farinha de trigo	N	N	BR	N	Colunar simples
Fialho <i>et al.</i> , 2009	Percevejo	Hemiptera	Adultos de <i>Brontocoris tabidus</i>	Tecidos de plantas e animais	N	N	NC	MPM	Colunar simples
Rocha <i>et al.</i> , 2014	Percevejo	Hemiptera	Adultos de <i>Triatoma vitticeps</i>	Sangue	N	N	NCR	MP	Colunar simples

Continuação.

Referência	Inseto	Ordem	Espécie	Alimentação do adulto	Goblet cells	Oxyntic/copper/cuprophilic cells	Células regenerativas individuais (CRI)/Ninho de células regenerativas (NCR)/Bolsas regenerativas (BR)	Matriz peritrófica (MP)/Membrana perimicrovilar (MPM)	Tipo de epitélio
Rost-Roszkowska <i>et al.</i> , 2017	Percevejo	Hemiptera	Adultos de <i>Cimex lectularius</i> e <i>Cimex pipistrelli</i>	Sangue	N	N	CRI	MPM	Colunar simples e cuboidal simples
Scudeler e Santos, 2014; Scudeler <i>et al.</i> , 2016; Scudeler <i>et al.</i> , 2022	Crisopídeo	Neuroptera	Adultos de <i>Ceraeochrysa claveri</i>	Pulgões, cochonilhas, moscas-brancas, ovos e larvas de diversos outros insetos, além de vários artrópodes de pequeno tamanho e de tegumento mole (Almeida <i>et al.</i> , 2009)	N	N	NCR	MP	Pseudoestratificado
Vacacela <i>et al.</i> , 2017	Crisopídeo	Neuroptera	Adultos de <i>Ceraeochrysa cubana</i>		N	N	CRI	MP	Colunar simples
Wanderley-Teixeira <i>et al.</i> , 2006	Gafanhoto	Orthoptera	Adultos de <i>Tropidacris collaris</i>	Principalmente grama (Terra e Ferreira, 2020)	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Li <i>et al.</i> , 2018	Gafanhoto	Orthoptera	Adultos de <i>Gampsocleis gratiosa</i>		N	N	NCR	MP	Colunar simples
Fathy e El-Rahman, 2023	Gafanhoto	Orthoptera	Adultos de <i>Locusta migratoria</i>		S	N	CRI	MP	Colunar simples
Biagio <i>et al.</i> , 2009	Grilo	Orthoptera	Adultos de <i>Grylloides sigillatus</i>	Onívoria (Terra e Ferreira, 2020)	N	N	NCR	MP	Colunar simples
Çakici e Ergen, 2012	Grilo	Orthoptera	Adultos de <i>Melanogryllus desertus</i>		N	N	NCR	MP	Colunar simples
Robinson e Strickland, 1969; Majumdar <i>et al.</i> , 2016	Barata	Dictyoptera	Adultos de <i>Periplaneta americana</i>	Onívoria	NC	N	NCR	MP	Colunar simples

Continuação.

Fonte: elaborado pela autora.

Ainda, há outro tipo de célula comumente descrito no intestino médio de abelhas, as células endócrinas, as quais desempenham papel no controle do peristaltismo, da digestão e da diurese (Cruz-Landim, 2009). Essas células são encontradas exclusivamente na região posterior do intestino médio, como observado em abelhas sem ferrão *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Neves *et al.*, 2003) e *Friesella schrottkyi* (Oliveira *et al.*, 2019), em abelhas sociais, como *Bombus morio* (Gonçalves *et al.*, 2014) e *Apis mellifera* (Raes e Verbeke, 1994), e em abelhas solitárias, como *Centris fuscata* (Santos *et al.*, 2015). Na porção mediana do intestino médio das abelhas aqui estudadas, essas células não foram observadas.

Dentre os insetos que possuem ninhos de células regenerativas no epitélio intestinal, a organização que exibem é a mesma: os ninhos localizam-se na base do epitélio, estando abaixo ou entre as células colunares, as quais tem a borda em escova voltada para o lúmen do órgão (Bution *et al.*, 2006; Çakici e Ergen, 2012; Oliveira *et al.*, 2019; Farder-Gomes *et al.*, 2021; Scudeler *et al.*, 2022). Nas espécies de abelhas aqui estudadas, a arquitetura é diferenciada em relação aos demais insetos, pois as células digestivas diferenciam-se a partir do ninho em direção ao lúmen, formando várias camadas de acordo com seu grau de desenvolvimento, o qual pode ser observado com o surgimento da borda em escova no interior de cavidades. Apenas ao final do processo de diferenciação é que as células digestivas projetam a borda em escova para o lúmen do órgão. Apesar dessa organização em camadas, todas as células digestivas estão em contato com a lâmina basal e seus núcleos são alinhados, ao contrário do que é observado no epitélio pseudoestratificado (Junqueira e Carneiro, 2013).

Nas abelhas da espécie *Apis mellifera*, também já foi encontrado um espaço extracelular formado entre quatro células digestivas acima do ninho de células regenerativas, preenchido com conteúdo eletrodense e microvilosidades (Raes *et al.*, 1994). Segundo os autores, o espaço extracelular forma-se pela fusão de vários espaços menores que, inicialmente, contêm algum material eletrodense; depois, grânulos densos e, finalmente, as microvilosidades recém-formadas. Ainda, observou-se que o complexo de Golgi produz pequenas vesículas eletrodensas, as quais podem ser encontradas em abundância na borda dos espaços extracelulares. Essas vesículas são liberadas por exocitose para o espaço extracelular, formando o material eletrodense ali presente (Raes *et al.*, 1994).

Raes *et al.* (1994) também verificaram que as vesículas de secreção e o material eletrodense presente no espaço extracelular têm a mesma eletropacidade; ainda, ambos são positivos para glicosaminoglicanos e proteínas. Os espaços extracelulares foram marcados com rodaminil-faloidina, provando a existência de F-actina e seu papel na formação das microvilosidades (Raes *et al.*, 1994).

Em traças (*Lepisma saccharina* e *Thermobia domestica*, ordem Thysanura), também foi relatada a existência de estruturas denominadas vacúolos extracelulares entre as células digestivas, possuindo material eletrodense e microvilosidades (Rost, 2006).

Em ambas as espécies de abelhas aqui estudadas, as células digestivas da porção mediana do intestino médio, formadoras das cavidades, possuem vacúolos contendo material eletrodense, encontrados principalmente em seu citoplasma apical, e cisternas do complexo de Golgi. Ainda, as cavidades possuem conteúdo eletrodense com a mesma opacidade observada nos vacúolos, sendo ambos positivos ao PAS, indicando a presença de carboidratos. Sendo assim, os vacúolos eletrodensos podem estar contribuindo com a formação do material presente nas cavidades, o qual também pode ter papel na formação das microvilosidades.

Além de carboidratos, as cavidades entre as células digestivas possuem proteínas, como foi mostrado por meio da coloração Xylidine Ponceau, e são acidófilas, como indicado pela coloração HE.

As mesmas características encontradas no citoplasma das células formadoras das cavidades foram observadas nas células digestivas com as microvilosidades projetadas para o lúmen do intestino médio. Sendo assim, os carboidratos presentes no citoplasma dessas células podem ser componentes da matriz peritrófica, pois esta é constituída de proteínas e quitina, um tipo de carboidrato, e podem indicar uma participação na secreção da matriz peritrófica (Cruz-Landim, 2009; Fialho *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2015).

Depósitos lipídicos também foram encontrados no citoplasma de todas as células digestivas, sendo raros nas células sem microvilosidades. Os lipídios, assim como os carboidratos, são componentes essenciais da membrana plasmática e sua presença pode estar relacionada com a formação das microvilosidades. Cisternas do retículo endoplasmático liso também foram observadas no citoplasma perinuclear, o que indica a síntese de lipídios nessas células (Li e Jing, 2020).

Ainda, no citoplasma apical, numerosas mitocôndrias concentram-se sob as microvilosidades. Essa organização sugere alta taxa de absorção na região mediana do intestino médio, pois as microvilosidades aumentam a área da superfície celular, enquanto que as mitocôndrias permitem o mecanismo de transporte ativo de moléculas (Serrão e Cruz-Landim, 1995; Serrão e Cruz-Landim, 1996). Isso é necessário, pois as abelhas não possuem ceco gástrico, uma especialização do intestino médio para a absorção de nutrientes (Serrão e Cruz-Landim, 1995). Ainda, a presença de autofagossomos no citoplasma apical indica a alta atividade das células digestivas, uma vez que os autofagossomos participam na remoção de organelas danificadas e reciclagem de componentes intracelulares (Oliveira *et al.*, 2019). Não

foram encontradas mitocôndrias no citoplasma das microvilosidades das células digestivas, como ocorre em *goblet cells* e em células oxínticas (Anderson e Harvey, 1966; Terra *et al.*, 1988).

No domínio basal do citoplasma das células epiteliais a membrana plasmática dobra-se, formando o labirinto basal. Nessa região, também foi observada a presença de mitocôndrias, as quais estão relacionadas ao transporte ativo de moléculas entre as células e a hemolinfa (Serrão *et al.*, 2008).

A lâmina basal, como mostrou a coloração HE, é uma estrutura acidófila composta por carboidratos, uma vez que reagiu ao PAS, e proteínas, o que foi evidenciado pela coloração Xylidine Ponceau. Ainda, foi observado que a lâmina basal possui subestruturas que formam estrias, que em secções transversais revelam-se poliédricas.

Em outras abelhas e demais insetos, a lâmina basal apresenta-se inteiramente como uma estrutura amorfa. Contudo, subestruturas formando padrões também foram observadas na lâmina basal de insetos de outras ordens, como no mosquito *Aedes dorsalis* (Diptera) (Houk *et al.*, 1980) e em várias espécies de besouros (Coleoptera) (Holter, 1970).

A análise dos grãos de pólen presentes na face luminal da parte mediana do intestino médio das abelhas das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis* permitiu identificar algumas espécies de plantas visitadas por essas abelhas. As plantas utilizadas são preponderantemente melitófilas, ou seja, a polinização ocorre por meio de abelhas ou outros himenópteros que se alimentam de pólen ou néctar (Silva, 2009). Plantas da família Melastomataceae e do gênero *Senna* sp. também foram encontradas no lúmen intestinal das abelhas, sendo plantas com anteras poricidas (Silva, 2009). Ainda, grãos de pólen do gênero *Passiflora* estiveram presentes no intestino médio de ambas as abelhas, sendo pertencentes ao maracujá, uma planta de interesse econômico, na qual as abelhas do gênero *Xylocopa* têm grande importância na polinização por terem porte grande (Siqueira *et al.*, 2009; Varassim *et al.*, 2012; Barrera *et al.*, 2020).

A maior parte dos grãos de pólen presentes no lúmen do intestino médio apresentaram-se íntegros; entretanto, alguns tinham sua estrutura modificada, como a cápsula rompida, conteúdo interno ausente ou extravasando da cápsula. Isso indica que houve digestão de seus componentes. Na espécie *Apis* melífera, já foi observado que alguns grãos de pólen encontrados no intestino médio podem ser digeridos (Klungness e Peng, 1984). Polissacarídeos carboxilados presentes nos grãos de pólen são eficientemente digeridos e absorvidos; contudo, a hemicelulose e os ácidos pécticos presentes na parede dos grãos são digeridos parcialmente, enquanto que a celulose e a esporopolenina não sofrem digestão (Klungness e Peng, 1984). Bactérias presentes no intestino das abelhas melíferas têm uma função importante na

degradação da parede do pólen (Zheng *et al.*, 2019). Ainda, em uma investigação sobre os efeitos dos grãos de pólen na longevidade e no peso de operárias da espécie *Apis mellífera* na presença e na ausência da microbiota intestinal, confirmou-se que a dieta adequada com grãos de pólen em combinação com a presença da microbiota tem um efeito positivo na saúde das operárias (Brown *et al.*, 2022).

As características do intestino médio observadas nas diferentes espécies de insetos podem ter relação com sua história de vida, como hábitos sociais ou alimentares, principalmente aquelas presentes na porção mediana do intestino médio, uma vez que é o principal local de digestão e absorção de nutrientes. As características do canal alimentar de espécies de abelhas não sociais, como *X. suspecta* e *X. frontalis*, precisam ser melhor investigadas para que possamos entender os impactos de estressores ambientais, como os inseticidas, em sua bionomia.

### 3.5 CONCLUSÕES

As características epiteliais do intestino médio das espécies de abelhas *X. suspecta* e *X. frontalis* mostraram-se semelhantes entre elas e entre as demais espécies de abelhas. Contudo, há peculiaridades como a presença de cavidades preenchidas com microvilosidades entre as células digestivas em desenvolvimento e uma lâmina basal com elementos organizados. Os grãos de pólen presentes no lúmen do intestino médio dessas abelhas confirmam sua importância na polinização de espécies de plantas melitófilas e com anteras poricidas. Ainda, alguns desses grãos foram encontrados digeridos, indicando serem parte da dieta das abelhas. Sendo assim, as espécies *X. suspecta* e *X. frontalis* possuem características morfológicas do intestino inéditas que devem ser melhor estudadas para subsidiar avaliação de risco e a proteção desses organismos importantes na polinização da vegetação natural e cultivada.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. F.; BARROS, R.; GONDIM JÚNIOR, M. G. C.; FREITAS, S.; BEZERRA, A. L. Biologia de *Ceraeochrysa claveri* Navás (Neuroptera: Chrysopidae) predando *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 313-318, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000200001>. Acesso em: 20/12/2024.
- ANDERSON, E.; HARVEY, W. R. Active transport by Cecropia midgut. **The Journal of Cell Biology**, v. 31, 1966.
- ANZENBERG, G. Ethological study of african carpenter bees of the Genus *Xylocopa* (Hymenoptera, Anthophoridae). **Z. Tierpsychol.**, v. 44, p. 337-374, 1977.
- ARAUJO, R. S.; FERNANDES, K. M.; LOPES, M. P.; MARTINS, G. F.; TAVARES, M. G. Epithelial remodelling of the midgut in the post-embryonic development of *Partamona helleri* (Apidae, Meliponini). **Apidologie**, v. 50, p. 80-89, 2019.
- ASENCOT, M.; LENSKY, Y. The effect of sugars and juvenile hormone on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) to queens. **Life Sciences**, v. 18, p. 693-700, 1976.
- AUSTIN, A. J.; GILBERT, J. D. J. Solitary bee larvae prioritize carbohydrate over protein in parentally provided pollen. **Funct. Ecol.**, v. 35, p. 1069--1080, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1365--2435.13746>. Acesso em: 15/10/2024.
- AZEVEDO, D. O.; NEVES, C. A.; MALLET, J. R. D.; GONÇALVES, T. C. M.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Notes on Midgut Ultrastructure of *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 435-441, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/033.046.0304>. Acesso em: 11/10/2024.
- BARRERA, W. B.; TRINIDAD, K. A. D.; PRESAS, J. A. Hand pollination and natural pollination by carpenter bees (*Xylocopa* spp.) in *Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg. (yellow passion fruit). **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 845-852, 2020. Disponível em: <https://doi.org.ez31.periodicos.capes.gov.br/10.1080/00218839.2020.1842580>. Acesso em: 13/05/2025
- BIAGIO, F. P.; TAMAKI, F. K.; TERRA, W. R.; RIBEIRO, A. F. Digestive morphophysiology of *Grylloides sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 1125-1133, 2009.
- BONELLI, M.; BRUNO, D.; CACCIA, S.; SGAMBETTERRA, G.; CAPPELLOZZA, S.; JUCKER, C.; TETTAMANTI, G.; CASARTELLI, M. Structural and Functional Characterization of *Hermetia illucens* Larval Midgut. **Front. Physiol.**, v. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00204>. Acesso em: 14/05/2024.
- BROTHERS, D. J. Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). **Zoologica Scripta**, v. 28, p. 233-249, 1999.
- BROWN, M. R.; RAIKHEL, A. S.; LEA, A. O. Ultrastructure of midgut endocrine cells in the adult mosquito *Aedes aegypti*. **Tissue & Cell**, v. 17, n. 5, p. 709-721, 1985.

BROWN, A. F.; RODRIGUEZ, V.; BRZOSKA, C.; PFISTER, J.; NEUMANN, P.; RETSCHNIG, G. Dream Team for Honey Bee Health: Pollen and Unmanipulated Gut Microbiota Promote Worker Longevity and Body Weight. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/sustainable-food-systems/articles/10.3389/fsufs.2022.864741>. Acesso em: 24/08/2023.

BUTION, M. L.; CAETANO, F. H.; BRITTO, F. B.; TOMAINO GOMES, G. A.; ZARA, F. J. Histology and histochemistry of the ventriculus of *Dolichoderus* (=Monacis) *bispinosus* (OLIVIER, 1792) (Hymenoptera: Formicidae). **Micron**, v. 37, p. 249-254, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.10.004>. Acesso em: 31/10/2022.

BUTION, M. L.; CAETANO, F. H. The midgut of Cephalotes ants (Formicidae: Myrmicinae): Ultrastructure of the epithelium and symbiotic bacteria. **Micron**, v. 41, n. 5, p. 448-454, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.02.005>. Acesso em: 31/10/2022.

CACCIA, S.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTI, G. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. **Cell and Tissue Research**, v. 377, p. 505-525, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>. Acesso em: 18/09/2024.

ÇAKICI, O.; ERGEN, G. Histologic description of midgut in *Melanogryllus desertus* (Pallas, 1771) (Orthoptera: Gryllidae). **Biharean Biologist**, v. 6, n. 2, p.108-111, 2012. Disponível em: <https://biozoojournals.ro/bihbiol/cont/v6n2/bb.121116.Cakici.pdf>. Acesso em: 06/01/2024.

CARNEIRO, L. S.; TEIXEIRA, S. A. M. V.; GONÇALVES, W. G.; FERNANDES, K. M.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Histochemistry, immunohistochemistry and cytochemistry of the anterior midgut region of the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Micron**, v. 113, p. 41-47, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.06.017>. Acesso em: 21/10/2022.

CARDINAL, S.; DANFORTH, B. N. The antiquity and evolutionary history of social behavior in bees. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, e21086, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021086>. Acesso em: 17/10/2024.

CEYLAN, A.; SEVİN, S.; ÖZGENÇ, O. Histomorphological and histochemical structure of the midgut and hindgut of the Caucasian honey bee (*Apis mellifera caucasica*). **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 43, n. 6, p. 747-753, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3906/vet-1906-55>. Acesso em: 11/10/2024.

CHAPMAN, R. F. **The Insects**. Structure and Function. Cambridge University Press, Cambridge, 2013.

COELHO, S. A new staining schedule for formalin-fixed, glycol methacrylate-embedded fish ovaries. **J. Fish. Biol.**, v. 34, p. 329-330, 1989.

CRAILSHEIM, K., SCHNEIDER, L. H. W.; HRASSNIGG, N.; BUHLMANN, G.; BROSCH, U. Pollen consumption and utilization in worker honey bee *Apis mellifera carnica*: dependence on individual age and function. **J. Insect Physiol.**, v. 38, p. 409-419, 1992.

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

DE PAULA, J. C.; DOELLO, K.; MESAS, C.; KAPRAVELOU, G.; CORNET-GÓMEZ, A.; ORANTES, F. J.; MARTÍNEZ, R.; LINARES, F.; PRADOS, J. C.; PORRES, J. M.; OSUNA, A.; PABLOS, L. M. Exploring honeybee abdominal anatomy through Micro-CT and novel multi-staining approaches. **Insects**, v. 13, n. 556, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects13060556>. Acesso em: 20/06/2023.

DOMINGUES, C. E. C.; INOUE, L. V. B.; GREGORC, A.; ANSALONI, L. S.; MALASPINA, O.; MATHIAS DA SILVA, E. C. Ultrastructural Changes in the Midgut of Brazilian Native Stingless Bee *Melipona scutellaris* Exposed to Fungicide Pyraclostrobin. **Toxics**, v. 11, n. 1028, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/toxics11121028>. Acesso em: 15/02/2024.

ENDO, Y.; NISHITSUTSUJI-UWO, J. Gut endocrine cells in insects: the ultrastructure of the gut endocrine cells of the lepidopterous species. **Biomedical Research**, v. 2, n. 3, p. 270-280, 1981.

FARDER-GOMES, C. F.; FERNANDES, K. M.; BERNARDES, R. C.; BASTOS, D. S. S.; MARTINS, G. F.; SERRÃO, J. E. 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, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145679>. Acesso em: 05/12/2024.

FATHY, Z.; EL-RAHMAN, R. M. A. Effect of entomopathogenic nematodes *Steinernema* species (steinernematidae: rhabditida) and *Heterorhabditis* bacteriophora (Heterorhabditidae: Rhabditida) on the digestive enzymes and midgut histology of the African migratory locust *Locusta migratoria migratorioides* (Acrididae: Orthoptera). **Int J Trop Insect Sci**, v. 43, p. 727-736, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42690-023-00979-8>. Acesso em: 23/01/2025.

FIALHO, M. C. Q.; ZANUNCIO, J. C.; NEVES, C. A.; RAMALHO, F. S.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure of the Digestive Cells in the Midgut of the Predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) After Different Feeding Periods on Prey and Plants. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 102, n. 1, p. 119-127, 2009.

FIALHO, M. C. Q.; TERRA, W. R.; MOREIRA, N. R.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure and immunolocalization of digestive enzymes in the midgut of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). **Arthropod Struct. Dev.**, v. 42, p. 277-285, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.asd.2013.03.002>. Acesso em: 17/10/2022.

FREITAS, B. M.; SILVA, C. I.; BEZERRA, A. D. M. **A história natural ilustrada de um polinizador: a abelha mamangava *Xylocopa frontalis***. 1ª ed. São Paulo: A.B.E.L.H.A., 2017.

GOMES, F. M.; CARVALHO, D. B.; MACHADO, E. A.; MIRANDA, K. Ultrastructural and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of the lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. **Cell Tissue Res.**, v. 352, p. 313-326, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1563-4>. Acesso em: 14/04/2023.

GONÇALVES, W. G.; FERNANDES, K. M.; BARCELLOS, M. S.; SILVA, F. P.; MAGALHÃES-JUNIOR, M. J.; ZANUNCIO, J. C.; MARTINS, G. F.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure and Immunofluorescence of the midgut of *Bombus morio* (Hymenoptera: Apidae: Bombini). **C. R. Biologies**, v. 337, p. 365-372, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2014.04.002>. Acesso em: 14/10/2022.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M. S. **Evolution of the insects**. Melbourne (VIC): Cambridge University Press, 2005.

HARANO, K.; SASAKI, T. Fuel provisioning for pollen collection by solitary bee, *Andrena taraxaci orienticola*. **Apidologie**, v. 55, n. 59, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-024-01099-z>. Acesso em: 15/10/2024.

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 54, p. 285-302, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>. Acesso em: 20/10/2023.

HOLTER, P. Z. Regular grid-like substructures in the midgut epithelial basement membrane of some Coleoptera. **Z. Zellforsch**, v. 110, p. 373-385, 1970.

HOUR, E. J.; CHILES, R. E.; HARDY, J. L. Unique midgut basal lamina in the mosquito, *Aedes dorsalis* (Meigen) (Insecta: Diptera). **Int. J. Insect Morphol. & Embryol.**, v. 9, p. 161-164, 1980.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KLUNGNESS, L. M.; PENG, Y. S. Histochemical study of pollen digestion in the alimentary canal of honeybees (*Apis mellifera* L.). **J. Insect. Physiol.**, v. 30, n. 7, p. 511-521, 1984.

KUNIEDA, T.; FUJIKI, T.; KUCHARSKI, R.; FORET, S.; AMENT, S. A.; TOTH, A. L.; OHASHI, K.; TAKEUCHI, H.; KAMIKOUCHI, A.; KAGE, E.; MORIOKA, M.; BEYE, M.; KUBO, T.; ROBINSON, G. E.; MALESZKA, R. Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insight from the bee genome. **Insect Mol. Biol.**, v. 15, n. 5, p. 563-576, 2006.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 42, p. 525-550, 1997.

LI, K.; ZHANG, J-H.; YANG, Y-J.; HAN, W.; YIN, H. Morphology and fine organization of the midgut of *Gampsocleis gratiosa* (Orthoptera: Tettigoniidae). **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, e0200405, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200405>. Acesso em: 14/09/2023.

LI, S.; JING, X. Fates of dietary sterols in the insect alimentary canal. **Current Opinion in Insect Science**, v. 41, p. 106-111, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.08.001>. Acesso em: 08/08/2025.

- MAJUMDAR, S.; AMIR, M.; GUPTA, R.; YASMEEN, S. Histopathological effect of deltamethrin on the midgut of American cockroach, *Periplaneta americana* (Linn.) (Dictyoptera: Blattidae). **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 4, n. 5, p. 13-16, 2016.
- MAYHEW, P. J. Explaining global insect species richness: lessons from a decade of macroevolutionary entomology. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 166, p. 225-250, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/eea.12673>. Acesso em: 10/04/2024.
- MELO, G. A. R. Phylogenetic relationships and classification of the major lineages of Apoidea (Hymenoptera), with emphasis on the crabronid wasps. **Univ. Kans. Mus. Nat. Hist. Sci. Pap.**, v 14, p. 1-55, 1999.
- MICHENER, C. D. **The bees of the World**. 2ª ed. Baltimore: John Hopkins University Press, 2007.
- MIGUEL-ALIAGA, I.; JASPER, H.; LEMAITRE, B. Anatomy and physiology of the digestive tract of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v. 210, p. 357-396, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300224>. Acesso em: 23/12/2023.
- MOREIRA, D. R.; SOUZA, T. H. S.; GALHARDO, D.; PUENTES, S. M. D.; FIGUEIRA, C. L.; SILVA, B. G.; CHAGAS, F.; GIGLIOLLI, A. A. S.; TOLEDO, V. A. A.; RUVOLOTAKASUSUKIA, M. C. C. Imidacloprid Induces histopathological damage in the midgut, ovary, and spermathecal stored spermatozoa of queens after chronic colony exposure. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2022.
- NARDI, J. B.; BEE, C. M.; MILLER, L. A. Stem cells of the beetle midgut epithelium. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 296-303, 2010.
- NARDI, J. B.; BEE, C. M. Regenerative cells and the architecture of beetle midgut epithelia. **Journal of Morphology**, v. 273, p. 1010-1020, 2012.
- NATION, J. L. **Insect physiology and biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- NEVES, C. A.; GITIRANA, L. B.; SERRÃO, J. E. FMRFamide-like immunoreactive midgut endocrine cells in different castes of the bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae; Meliponini). **Braz. J. morphol. Sci.**, v. 20, n. 3, p. 157-164, 2003.
- NISHITSUTSUJI-UWO, J.; ENDO, Y. Gut endocrine cells in insects: the ultrastructure of the endocrine cells in the cockroach midgut. **Biomedical Research**, v. 2, n. 1, p. 30-44, 1981.
- OLIVEIRA, A. H.; GONÇALVES, W. G.; FERNANDES, K. M.; BARCELLOS, M. S.; SAMPAIO, W. M. S.; LOPES, M. P.; MARTINS, G. F.; SERRÃO, J. E. Morphology and morphometry of the midgut in the stingless bee *Friesella schrottkyi* (Hymenoptera: Apidae). **Insects**, v. 10, n. 3, p. 73, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/insects10030073>. Acesso em: 16/10/2023.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied**. Jet. Churchill Ltda: London, 1960.

RAES, H.; VERBEKE, M. Light and electron microscopical study of two types of endocrine cells in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera*). **Tissue Cell**, v. 26, n. 2, p. 223-30, 1994.

RAES, H.; VERBEKE, M.; MEULEMANS, W.; COSTER, W. Organization and ultrastructure of the regenerative crypts in the midgut of the adult worker honeybee (*L. Apis mellifera*). **Tissue and Cell**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 1994.

RAINFORD, J. L.; HOFREITER, M.; NICHOLSON, D. B.; MAYHEW, P. J. Phylogenetic distribution of extant richness suggests metamorphosis is a key innovation driving diversification in insects. **PLoS ONE**, v. 9, n.10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109085>. Acesso em: 07/08/2024.

RAJU, A. J. S.; RAO, S. P. Nesting habits, floral resources and foraging ecology of large carpenter bees (*Xylocopa latipes* and *Xylocopa pubescens*) in India. **Current Science**, v. 90, n. 9, p. 1210-1217, 2006

ROBINSON, E. S.; STRICKLAND, B. C. Cellular responses of *Periplaneta americana* to *Acanthocephalan* larvae. **Experimental Parasitology**, v. 26, p. 384-392, 1969.

ROCHA, L. L. V.; NEVES, C. A.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Endocrine and regenerative cells in the midgut of Chagas' disease vector *Triatoma vitticeps* during different starvation periods. **Folia Biologica (Kraków)**, v. 62, n. 3, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25403079/>. Acesso em: 27/09/2024.

ROST, M. M. Comparative Studies on Regeneration of the Midgut Epithelium in *Lepisma saccharina* and *Thermobia domestica*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, n. 5, p. 910-916, 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2006\)99\[910:CSOROT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)99[910:CSOROT]2.0.CO;2). Acesso em: 29/03/2024.

ROOIJAKKERS, E. F.; SOMMEIJER, M. J. Gender specific brood cells in the solitary bee *Colletes halophilus* (Hymenoptera; Colletidae). **J. Insect. Behav.**, v. 22, p. 492-500, 2009.

SANTOS, D. E.; ZANUNCIO, J. C.; OLIVEIRA, A. A. G.; SERRÃO, J. E. Endocrine cells in the midgut of bees (Hymenoptera: Apoidea) with different levels of sociability. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 4, p. 394-398, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1158535>. Acesso em: 27/09/2024.

SANTOS, H. P.; ROST-ROSZKOWSKA, M.; VILIMOVA, J.; SERRÃO, J. E. Ultrastructure of the midgut in Heteroptera (Hemiptera) with different feeding habits. **Protoplasma**, v. 254, p. 1743-1753, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1051-2>. Acesso em: 06/09/2024.

SCUDELER, E. L.; SANTOS, D. C. Side effects of neem oil on the midgut endocrine cells of the green lacewing *Ceraeochrysa claveri* (Navás) (Neuroptera: Chrysopidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 43, n. 2, p. 154-60, 2014.

SCUDELER, E. L.; GARCIA, A. S. G.; PADOVANI, C. R.; PINHEIRO, F. F.; SANTOS, D. C. Cytotoxic effects of neem oil in the midgut of the predator *Ceraeochrysa claveri*. **Micron**,

v. 80, p. 96-111, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2015.10.005>. Acesso em: 13/03/2024.

SCUDELER, E. L.; CARVALHO, S. F.; GARCIA, A. S. G.; SANTORUM, M.; PADOVANI, C. R.; SANTOS, D. C. Midgut and fat body: Multisystemic action of pyriproxyfen on non-target organism *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Pollution**, v. 293, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118580>. Acesso em: 02/02/2024.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. The striated border of digestive cells in adult stingless bee (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Cytobios**, v. 83, p. 229-235, 1995.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **J Adv Zool**, v. 17, n. 1, p. 1-17, 1996.

SERRÃO, J. E.; RONNAU, M.; NEVES, C. A.; CAMPOS, L. A. O.; ZANUNCIO, J. C. Ultrastructure of anterior midgut region of corbiculate bees (Hymenoptera: Apidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 5, p. 915-921, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2008\)101\[915:UOAMRO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2008)101[915:UOAMRO]2.0.CO;2). Acesso em: 25/10/2023.

SILVA, C. I. **Distribuição espaço-temporal de recursos florais utilizados por *Xylocopa* spp. e interação com plantas de cerrado sentido restrito no Triângulo Mineiro**. 2009. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

SILVA, C. I.; ALEIXO, K. P.; NUNES-SILVA, B.; FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras no Brasil**. 1ª ed. São Paulo: Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, 2014.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; COSTA-FERREIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Structure and function of the intestine and Malpighian tubules - from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. In: STEWART, E.M. (Org.). **Social Insects - Structure, Function, and Behavior**. 1 ed. Nova Publishers: New York, 2011.

SIMON, S.; STRAUSS, S.; HAESELER, A.; HADRY, H. A phylogenomic approach to resolve the basal Pterygote divergence. **Mol. Biol. Evol.**, v. 26, n. 12, p. 2719-2730, 2009.

SIQUEIRA, K. M. M.; KIILL, L. H. P.; MARTINS, C. F.; LEMOS, I. B.; MONTEIRO, S. P.; FEITOZA, E. A. Ecologia da polinização do maracujá-amarelo, na região do vale do submédio São Francisco. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 31, n. 1, p. 001-012, 2009.

SOMMEIJER, M. J.; ROOIJAKKERS, E. F.; ACOBUSSE, C.; KERKVLIT, J. D. Larval food composition and food plants of the solitary bee *Colletes halophilus* (Hymenoptera: Colletidae). **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 48, n. 3, p. 149-155, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.01>. Acesso em: 15/10/2024.

SZOLDERITS, M. J.; CRAILSHEIM, K. A comparison of pollen consumption and digestion in honeybee *Apis mellifera carnica* drones and workers. **J. Insect Physiol.**, v. 39, p. 877-881, 1993.

TADEI, R.; CASTOR, R. E. S.; MALASPINA, O.; SILVA, E. C. M. Effect of neonicotinoid and fungicide strobilurin in neotropical solitary bee *Centris analis*. **Environmental Pollution**, v. 360, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.124712>. Acesso em: 10/04/2025.

TEIXEIRA, A. D.; MARQUES-ARAÚJO, S.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. Peritrophic membrane origin in adult bees (Hymenoptera): Immunolocalization. **Micron**, v. 68, p. 91-97, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2014.09.009>. Acesso em: 07/03/2024.

TERRA, W. R. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 675-734, 1988.

TERRA, W. R.; ESPINOZA-FUENTES, F. P.; RIBEIRO, A. F.; FERREIRA, C. The larval midgut of the housefly (*Musca domestica*): ultrastructure, fluid fluxes and ion secretion in relation to the organization of digestion. **J. Insect Physiol.**, v. 34, n. 6, p. 463-472, 1988.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 109 B, n. 1, p. 1-62, 1994.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of digestion. *In*: GILBERT, L. I., IATROV, K.; GILL, S. (Org.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. v. 4. Elsevier, Oxford, 2005.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Evolutionary trends of digestion and absorption in the major insect orders. **Arthropod Structure & Development**, v. 56, 100931, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.asd.2020.100931>. Acesso em: 23/12/2023.

URBAN-MEAD, K. R.; WALTER, E.; MCART, S. H.; DANFORTH, B. N. Nearly half of spring-flying male *Andrena* bees consume pollen, but less than female conspecifics. **Apidologie**, v. 53, n. 49, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00951-4>. Acesso em: 16/10/2024.

VACACELA, H. E.; ALVAREZ-ZAPATA, A.; GONZALES, A. C.; MARTINS, E. F.; MARTÍNEZ, L. C.; SERRÃO, J. E. Anatomy and histology of the alimentary canal and ovarioles of *Ceraeochrysa cubana* adults. **Bulletin of Insectology**, v. 70, p. 181-188, 2017.

VARASSIN, I. G.; XIMENES, B. M. S.; MOREIRA, P. A.; ZANON, M. M. F.; ELBL, P.; LÖWENBERG-NETO, P.; MELO, G. A. R. Produção de néctar e visitas por abelhas em duas espécies cultivadas de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 1, p. 251-255. 2012.

VIDAL, B. C. Dichroism on collagen bundles stained with Xylidine ponceau 2R. **Ann Histochim.**, v. 15, p. 289-296, 1970.

VIEIRA DE JESUS, B. M.; GAROFALO, C. A. Nesting behaviour of *Centris (Heterocentris) analis* (Fabricius) in southeastern Brazil (Hymenoptera, Apidae, Centridini). **Apidologie**, v. 31, p. 503-515, 2000.

WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A. A. C.; CUNHA, F. M.; COSTA, M. K. C. M.; VEIGA, A. F. S. L.; OLIVEIRA, J. V. Histological description of the midgut and the pyloric valve of *Tropidacris collaris* (Stoll, 1813) (Orthoptera: Romaleidae). **Braz. J. Biol.**, v. 66, n. 4, p. 1045-1049, 2006.

WU, K.; LI, S.; WANG, J., NI, Y.; HUANG, W.; LIU, Q.; LING, E. Peptide hormones in the insect midgut. **Front. Physiol.**, v. 11, n. 191, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2020.00191/full>. Acesso em: 27/09/2024.

ZERBO, A. C.; MORAES, R. L. M. S.; BROCHETTO-BRAGA, M. R. Protein requirements in larvae and adults of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae): midgut proteolytic activity and pollen digestion. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 129, p. 139-147, 2001.

ZHENG, H.; PERREAU, J.; POWELL, J. E.; HAN, B.; ZHANG, Z.; KWONG, W. K. TRINGE, S. G.; MORAN, N.A. Division of labor in honey bee gut microbiota for plant polysaccharide digestion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 116, n. 51, p. 25909-25916, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1916224116>. Acesso em: 30/03/2023.

## 4 CAPÍTULO 4

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

As abelhas aqui estudadas, *X. suspecta* e *X. frontalis*, possuem características morfológicas do cérebro semelhantes aquelas já relatadas para outras abelhas. Contudo, algumas particularidades foram observadas, como o volume maior das neurópilas dos corpos pedunculados no cérebro da espécie *X. frontalis*, o que pode estar relacionado com sua biologia, sendo por isso necessário o desenvolvimento de estudos que explorem essa possível relação.

A caracterização do epitélio do intestino médio das espécies *X. suspecta* e *X. frontalis* revelou um arranjo celular inédito, sendo essencial a realização de mais estudos sobre a morfologia desse epitélio para a compreensão da relação dessa organização celular com as funções desempenhadas pelo intestino médio dessas abelhas.

A presença de pólen digerido no lúmen do intestino médio das abelhas também oferece informações importantes, pois indica que esse recurso floral também é utilizado na alimentação dos adultos, além do néctar. Sendo assim, as espécies *X. suspecta* e *X. frontalis* podem ser expostas aos agrotóxicos por meio desses dois recursos florais, reforçando a necessidade da realização de estudos ecotoxicológicos com essas abelhas. Ainda, grãos de pólen também foram observados aderidos no corpo das abelhas utilizadas nesta tese, principalmente nas escopas e no tórax, o que evidencia que elas também podem ser expostas aos agrotóxicos por meio do contato com o pólen contaminado.

Logo, os dados do presente estudo reforçam a importância de *X. frontalis*, e também outras espécies como *X. suspecta*, como abelha de interesse para Avaliação de Risco Ecológico no Brasil.

## APÊNDICE – A

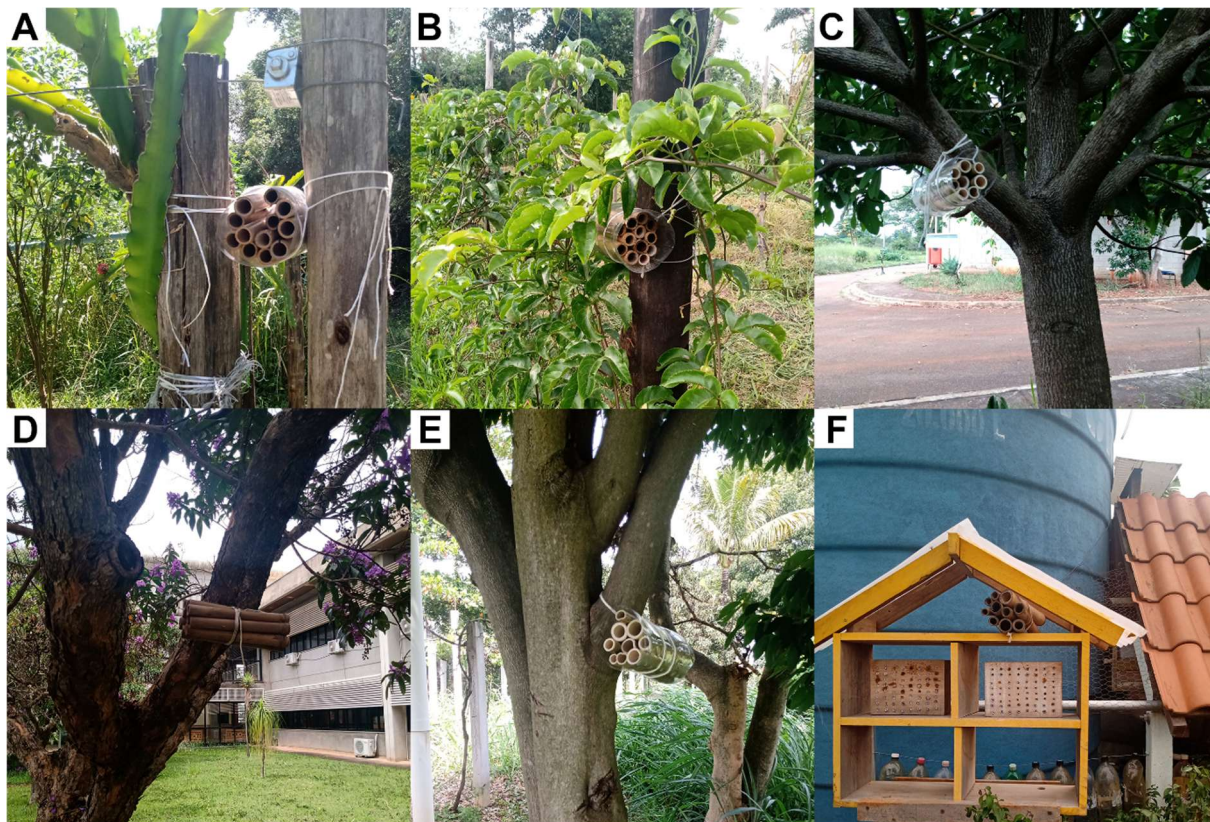
### Distribuição de ninhos artificiais para coleta de imaturos da espécie *Xylocopa frontalis*

Com o objetivo de realizar bioensaios ecotoxicológicos com imaturos da espécie *Xylocopa frontalis*, foram distribuídos ninhos artificiais em diversos locais. Para isso, foram selecionados colmos de bambus abertos em uma de suas extremidades, medindo aproximadamente 20 cm de comprimento e com 1,5 a 3 cm de diâmetro (Marchi e Melo, 2010; Pereira e Garófalo, 2010). Os ninhos artificiais foram alocados próximos às plantas de interesse dessas abelhas, como maracujazeiro, abacateiro, goiabeira, urucuzeiro, quaresmeira entre outras (figura 1) (Silva, 2009).

Em Sorocaba, os ninhos artificiais foram instalados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-So) (n = 81) e no Sistema Agroflorestal Sítio São João (SAF) (n = 59). Na cidade de Itu, eles foram alocados em propriedades particulares, sendo elas: Chácara do rosário (n = 10), Fazenda Capoava (n = 19), Fazenda Vassoural (n = 20), Fazenda Catavento (n = 39) e em uma horta comunitária (n = 10) (tabela 1). Os bambus foram limpos e inspecionados periodicamente.

Durante um ano de observação, os ninhos artificiais feitos com bambus foram ocupados por diversos organismos, como formigas, aranhas e abelhas do gênero *Centris*. Contudo, não houve a nidificação de abelhas da espécie *X. frontalis*, não sendo possível a realização dos bioensaios ecotoxicológicos com os imaturos.

Figura 1 – Alguns pontos de instalação dos ninhos artificiais. A) Plantação de pitaya. B) Maracujazeiro. C) Quaresmeira. D) Abacateiro. E) Árvore do gênero Senna. F) Hotel de abelhas localizado em horta comunitária.



Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 1 – Locais de instalação dos ninhos artificiais.

Cidade	Local de instalação	Número de bambus	Coordenadas
Sorocaba	UFSCar	81	23°34'55.482" S, 47°31'29.622" W
	SAF	59	23°35'16.786" S, 47°31'37.302" W
Itu	Chácara do Rosário	10	23°14'35.298" S, 47°18'7.978" W
	Fazenda Capoava	19	23°13'0.368" S, 47°10'57.526" W
	Fazenda Vassoural	20	23°14'33.371" S, 47°17'4.266" W
	Chácara Catavento	39	23°14'39.203" S, 47°8'51.054" W
	Horta comunitária	10	23°23'8.166" S, 47°20'52.944" W
	Total	238	

Fonte: elaborado pela autora.

## REFERÊNCIAS

- GENERSCH, E.; GISDER, S.; HEDTKE, K.; HUNTER, W. B.; MÖCKEL, N.; MÜLLER, U. Standard methods for cell cultures in *Apis mellifera* research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2013.
- KREISSL, S.; BICKER, G. Dissociated neurons of the pupal honeybee brain in cell culture. **Journal of Neurocytology**, v. 21, n. 8, p. 545-556, 1992.
- MARCHI, P.; MELO, G. A. R. Biologia de nidificação de *Xylocopa (Neoxylocopa) frontalis* (Olivier) (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini) em Morretes, Paraná. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 210-231, 2010.
- PEREIRA, M.; GARÓFALO, C. A. Biologia da nidificação de *Xylocopa frontalis* e *Xylocopa grisescens* (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini) em ninhos-armadilha. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 193-209, 2010.
- SILVA, C. I. **Distribuição espaço-temporal de recursos florais utilizados por *Xylocopa* spp. e interação com plantas de cerrado sentido restrito no Triângulo Mineiro**. 2009. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.
- TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Exposure to thiamethoxam during the larval phase affects synapsin levels in the brain of the honey bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 523-528, 2019.

## APÊNDICE – B

### Criação de abelhas adultas da espécie *Xylocopa frontalis* em laboratório

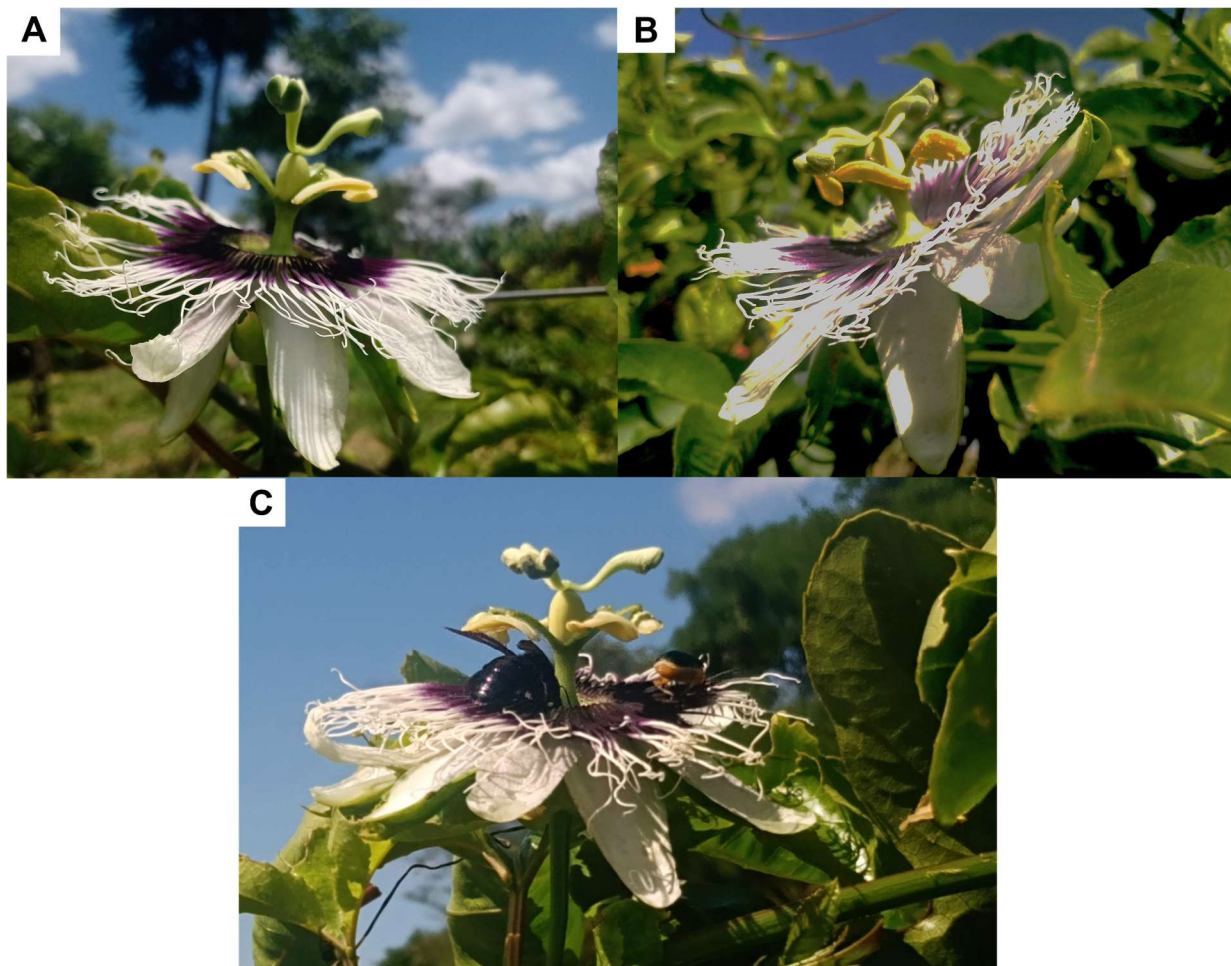
Com o objetivo de realizar bioensaios ecotoxicológicos com adultos da espécie *Xylocopa frontalis*, foram coletadas fêmeas na Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba (UFSCar-So), enquanto visitavam flores de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis*), o qual é cultivado em horta sem aplicação de agrotóxicos.

As coletas foram realizadas sempre das 12h00 às 15h00, horário de antese do maracujazeiro amarelo e de maior visitação dos polinizadores. Isso ocorre, pois, após abertas, suas flores voltam-se para cima e, cerca de 20 minutos depois, seus órgãos reprodutivos alinham-se, estando, assim, preparados para a polinização (Silva *et al.*, 2014) (figura 1). Ainda, para atração dos polinizadores, um odor é exalado e a quantidade de néctar é aumentada (Silva *et al.*, 2014). Após coletadas, as abelhas foram transferidas para potes plásticos individuais de 1L com perfurações para ventilação e levadas ao Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental da UFSCar-So.

No laboratório, as abelhas permaneceram na estufa de incubação do tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) em condições controladas de temperatura e umidade ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 10\%$  respectivamente, no escuro), sem alimento, por volta de 1 hora antes do início dos testes.

Após o período de 1 hora para a aclimação, as abelhas foram realocadas para as gaiolas de teste *in vitro*.

Figura 1 – Flores de maracujazeiro amarelo logo após a antese. A) Flor com o órgão reprodutor feminino voltado para cima. B) Flor com os órgãos masculino e feminino quase totalmente alinhados. C) Abelha do gênero *Xylocopa* visitando a flor de maracujazeiro.



Fonte: elaborado pela autora.

Para os testes, foram desenvolvidos dois tipos de gaiolas. Para o primeiro tipo, foram utilizados potes de plástico redondos de 1 L com tampa, medindo 12 cm de diâmetro e 14,4 cm de altura. Para a ventilação, foram feitos 23 furos de 0,5 cm de diâmetro em toda a lateral. Ainda, foi feito um furo (tamanho não padronizado) para encaixe do alimentador. Papel filtro foi colocado no chão da gaiola para absorção da sujeira (figura 2).

Como alimentadores, foram utilizados dois tipos: 1. frasco de plástico com tampa e fundo cônico, tipo Eppendorf, de 1,5 mL, no qual foi feito um furo de 0,3 cm de diâmetro para dar acesso ao alimento e sua superfície lixada para evitar que a abelha deslize enquanto se alimenta; 2. seringa de 3 mL.

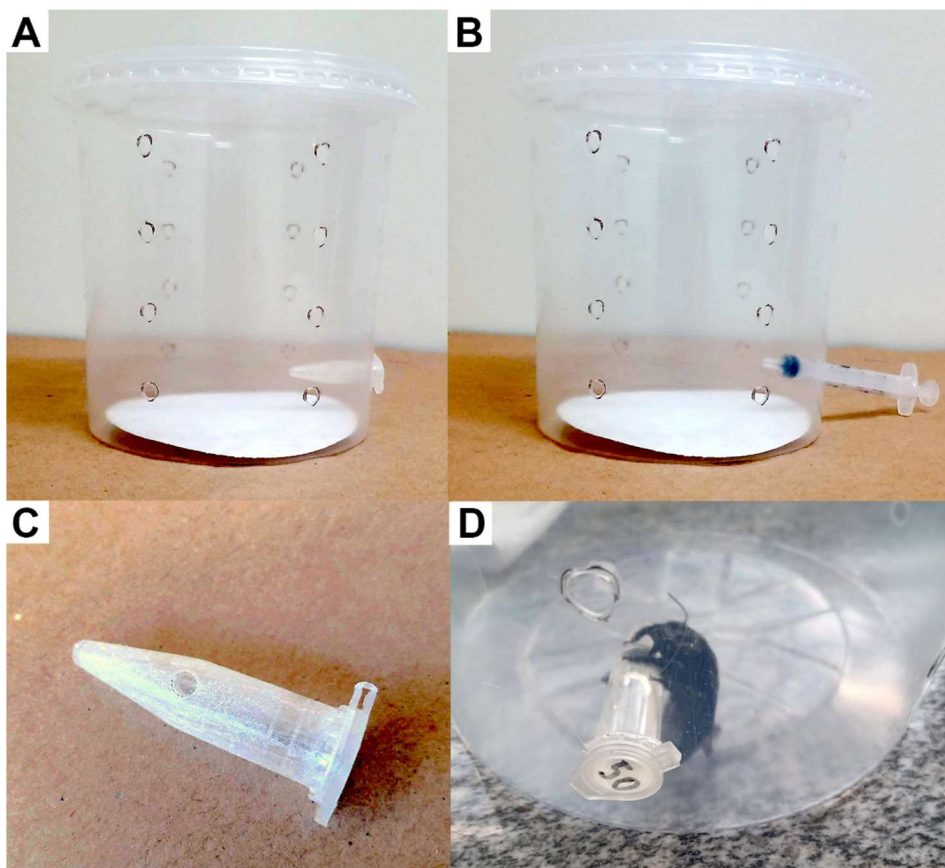
Foram destinadas 3 abelhas para os potes com os alimentadores do primeiro tipo e 4 abelhas para os potes com os alimentadores do segundo tipo. Com a finalidade de treinar as abelhas a encontrar o xarope no alimentador, antes de serem transferidas para os potes, elas

foram estimuladas a estender suas probóscides, colocando-se uma gota de xarope (45% açúcar cristal, 55% água filtrada) próxima às maxilas, com uma micropipeta de 10  $\mu$ l ou com uma pipeta Pasteur de 3 ml. Com a probóscide estendida, a abelha foi direcionada ao alimentador para que encontrasse o furo que dá acesso ao alimento (Tadei *et al.*, 2022).

Durante os testes, à todas as abelhas foi disponibilizado, *ad libitum*, xarope 45% (45% açúcar cristal, 55% água filtrada), sendo esta a concentração média encontrada no néctar de variedades de maracujá (Cobra *et al.*, 2017).

As abelhas permaneceram na estufa incubadora B.O.D. ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 10\%$  de umidade, no escuro) durante todo o período de teste. O consumo de xarope e a quantidade de indivíduos vivos foram verificados diariamente.

Figura 2 – Gaiolas confeccionadas com potes de plástico de 1 L seus respectivos alimentadores. A) Gaiola com alimentador confeccionado com frasco de plástico tipo Eppendorf. B) Gaiola com seringa de 3 mL, utilizada como alimentador. C) Alimentador confeccionado com frasco de plástico, tipo Eppendorf. D) Abelha no interior da gaiola, alimentando-se no frasco tipo Eppendorf.

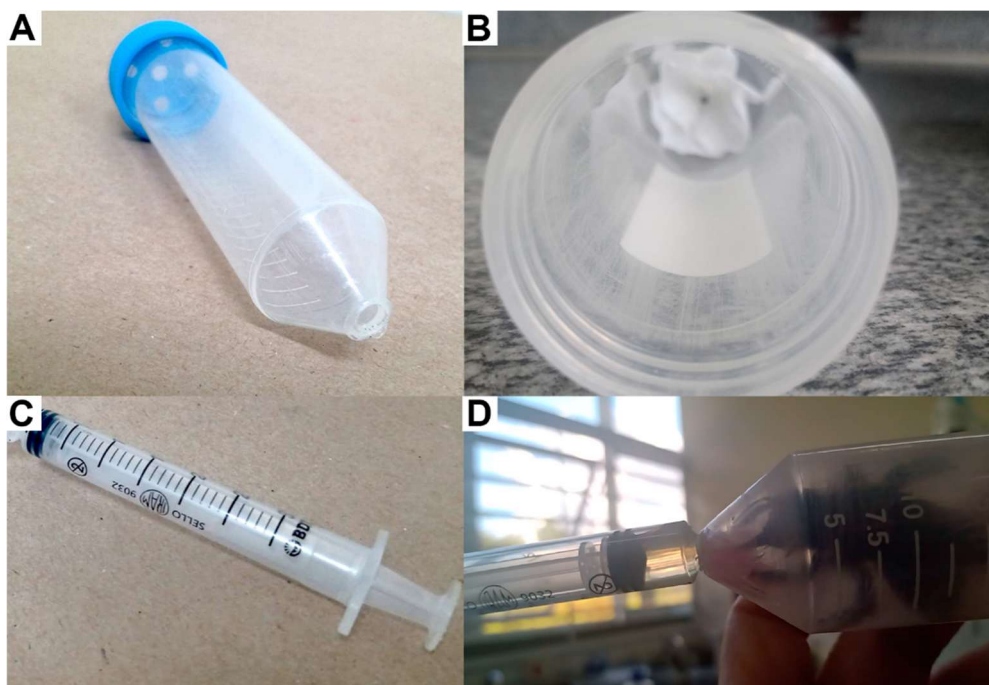


Fonte: elaborado pela autora.

O segundo tipo de gaiola foi baseado no modelo desenvolvido para as abelhas sociais *Bombus terrestris* (OECD, 2017). Para isso, utilizou-se tubos de plástico de 50 mL com fundo cônico, tipo Falcon, com 2,7 cm de diâmetro e 11,5 cm de altura, contendo, em uma extremidade, uma tampa de rosquear com 5 perfurações de 0,5 cm de diâmetro para entrada de ar e, na outra, um furo (tamanho não padronizado) com pétalas de poliéster brancas ou rosas coladas em volta para encaixe do alimentador, sendo este uma seringa de 3 mL. Todo o interior do tubo foi lixado para gerar atrito à abelha enquanto se desloca (figura 3). Um total de 4 abelhas foi utilizado e nenhuma foi treinada a encontrar o furo do alimentador, já que este tipo de gaiola limita a abelha a andar apenas em direção ao furo que dá acesso ao xarope ou em direção à tampa.

Assim como no outro modelo de gaiola, durante os testes, disponibilizou-se às abelhas xarope 45% *ad libitum*. Elas também permaneceram na estufa incubadora B.O.D. ( $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\% \pm 10\%$  de umidade, no escuro). Ainda, o consumo de xarope e a quantidade de indivíduos vivos foram verificados diariamente.

Figura 3 – Gaiolas confeccionadas com tubos de plástico de 50 mL, tipo Falcon, e seringa de 3 mL utilizada como alimentador. A) Tubo com furos na tampa para ventilação e no fundo para encaixe do alimentador. B) Tubo com seu interior lixado e pétalas no local de encaixe do alimentador. C) Seringa de 3 mL utilizada como alimentador. D) Abelha no interior do tubo, alimentando-se.



Fonte: elaborado pela autora.

Para averiguar o consumo diário ( $C$ ) de xarope, cada alimentador foi pesado, antes e depois de serem disponibilizado às abelhas, para obtenção das massas inicial ( $mi$ ) e final ( $mf$ ), respectivamente, as quais foram subtraídas. Ainda, calculou-se a média de evaporação do xarope ( $me$ ). Para isso, réplicas vazias de cada modelo de gaiola desenvolvido, contendo alimentadores preenchidos com xarope 45%, foram deixadas na estufa incubadora B.O.D. junto às gaiolas contendo as abelhas. As massas iniciais e finais desses alimentadores também foram subtraídas e a média desses valores foi calculada. Desse modo:  $C = mi - mf - me$

Os valores do consumo diário de xarope resultantes em g foram convertidos para  $\mu\text{L}$ . Para isso, 1.000  $\mu\text{L}$  de xarope foram pesados por três vezes para cálculo da média das massas

(*mm*). Os consumos em gramas foram multiplicados por 1.000 e o resultado dividido pela média da massa de 1.000  $\mu\text{L}$  de xarope, ou seja:  $x = C \times 1.000 \div mm$ .

Para testar o pote de 1 L com frascos alimentadores tipo Eppendorf (Pote 1), foram utilizadas 3 abelhas. Dessas, apenas 1 respondeu ao estímulo para encontrar o xarope no alimentador, tendo consumido 85,25  $\mu\text{L}$  de xarope em 24 horas e sobrevivido por 4 dias. As demais, não se alimentaram e sobreviveram por menos de 1 dia.

Nos potes de 1 L com seringas de 3 mL (Pote 2), das 4 abelhas utilizadas, apenas 1 respondeu ao estímulo para encontrar o alimento, consumindo 13,99  $\mu\text{L}$  de xarope em 24 horas. Em relação às outras abelhas, apenas 1 alimentou-se, consumindo 4,99  $\mu\text{L}$  de xarope em 24 horas. A sobrevivência de todas as abelhas foi de apenas 2 dias.

A dificuldade em estimular a maioria das abelhas a encontrar o alimento deveu-se ao fato de que todas elas se agitavam muito quando retiradas da incubadora, voando em direção à luz, o que complicou a manipulação delas com a pinça entomológica. Ainda, quando colocada uma gota de xarope próxima às antenas ou à probóscide, elas afastavam as antenas ou viravam a cabeça. Muitas também seguravam a pipeta com as mandíbulas e com as pernas. Sendo assim, tal procedimento se mostrou estressante para essas abelhas, o que pode ter influenciado no consumo de xarope. Uma pétala de flor de quaresmeira (*Tibouchina* sp.) foi colocada próxima ao furo de acesso ao xarope em todos os alimentadores, como um atrativo. Porém, não foi suficiente para estimular as abelhas a se alimentarem. Ainda, um cubo de madeira foi adicionado nos potes para descanso.

Nos tubos tipo Falcon, dos 4 indivíduos utilizados, apenas 1 não consumiu xarope. As quantidades de consumo de xarope foram 11,40  $\mu\text{L}$ , 93,02  $\mu\text{L}$  e 97,35  $\mu\text{L}$  em 24 horas. Apesar disso, o tempo de sobrevivência foi de apenas 2 dias.

Na tabela 1, pode-se observar todos os valores de consumo de xarope por dia em cada pote testado.

Tabela 1 – Consumo diário (C) de xarope ( $\mu\text{L}$ ) nos diferentes tipos de gaiolas testadas.

	C 1	C 2	C 3	C 4
<b>Pote 1</b>				
Abelha 1	85,25	0	0	0
Abelha 2	0	-	-	-
Abelha 3	0	-	-	-
<b>Pote 2</b>				
Abelha 1	0	0	-	-
Abelha 2	13,99	0	-	-
Abelha 3	0	0	-	-
Abelha 4	4,99	0	-	-
<b>Tubo</b>				
Abelha 1	11,4	0	-	-
Abelha 2	93,02	0	-	-
Abelha 3	0	0	-	-
Abelha 4	97,35	0	-	-

Fonte: elaborado pela autora.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que nenhum modelo de gaiola foi apropriado para a realização de bioensaios ecotoxicológicos, pois as abelhas devem permanecer vivas e alimentando-se em quantidades razoáveis por pelo menos 48 horas, sendo este o tempo mínimo de observação após exposição oral ao agrotóxico (OECD, 2017).

## REFERÊNCIAS

OECD. Test n. 247: Bumblebee, acute oral toxicity test. *In: OECD Guidelines for the testing of chemicals*, Section 2. Paris: OECD Publishing, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264284128-en>. Acesso em: 02/02/2023.

COBRA, S. S. O.; SILVA, C. A.; KRAUSE, W.; LAGE, L. A. Availability of floral resources in yellow passion fruit cultivars. *Comunicata Scientiae*, v. 8, n. 4, p. 555-561, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/cs.v8i4.207>. Acesso em: 02/02/2023.

SILVA, C. I.; MARCHI, P.; ALEIXO, K. P.; NUNES-SILVA, B.; FREITAS, B. M.; GARÓFALO, C. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; OLIVEIRA, P. E. A. M.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Manejo dos polinizadores e polinização de flores do maracujazeiro**. 1ª ed. São Paulo: Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, 2014.

Disponível em: <http://www.iea.usp.br/pesquisa/grupos/servecossistemas/publicacoes/manejo-dos-polinizadores-e-polinizacao-de-flores-do-maracujazeiro/view>. Acesso em:02/02/2023.

TADEI, R.; SILVA, C. I.; DECIO, P.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. Method for maintaining adult solitary bee *Centris analis* under laboratory conditions. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 00, p. 1-6, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13797>. Acesso em: 03/07/2023.

## APÊNDICE – C

Avaliação da viabilidade celular de fragmentos do intestino médio expostos ao imidacloprido

Diante da dificuldade para coletar indivíduos imaturos de abelhas do gênero *Xylocopa* ou indivíduos adultos em número suficiente para a realização de ensaios ecotoxicológicos, optou-se pela avaliação dos efeitos do imidacloprido na viabilidade celular de fragmentos do intestino médio de abelhas da espécie *X. frontalis*.

Para a obtenção dos fragmentos do intestino médio, foram coletadas 6 fêmeas da espécie *X. frontalis* durante forrageamento em flores do maracujazeiro. No laboratório, cada uma das abelhas foi crioanestesiada e esterilizada em etanol 70% por 1 minuto, líquido de Dakin por 2 minutos e etanol 70% por 3 minutos. Por fim, as abelhas foram lavadas de 3 a 5 vezes em solução salina balanceada de Hanks (HBSS). Sob estereomicroscópio (Leica EZ4HD), o intestino médio foi, então, dissecado por meio de uma incisão em cada extremidade, obtendo-se a porção mediana do órgão, a qual foi fragmentada em 6 partes (figura 1 – A). Durante a dissecação, o interior da cavidade abdominal foi lavado com HBSS contendo antibióticos.

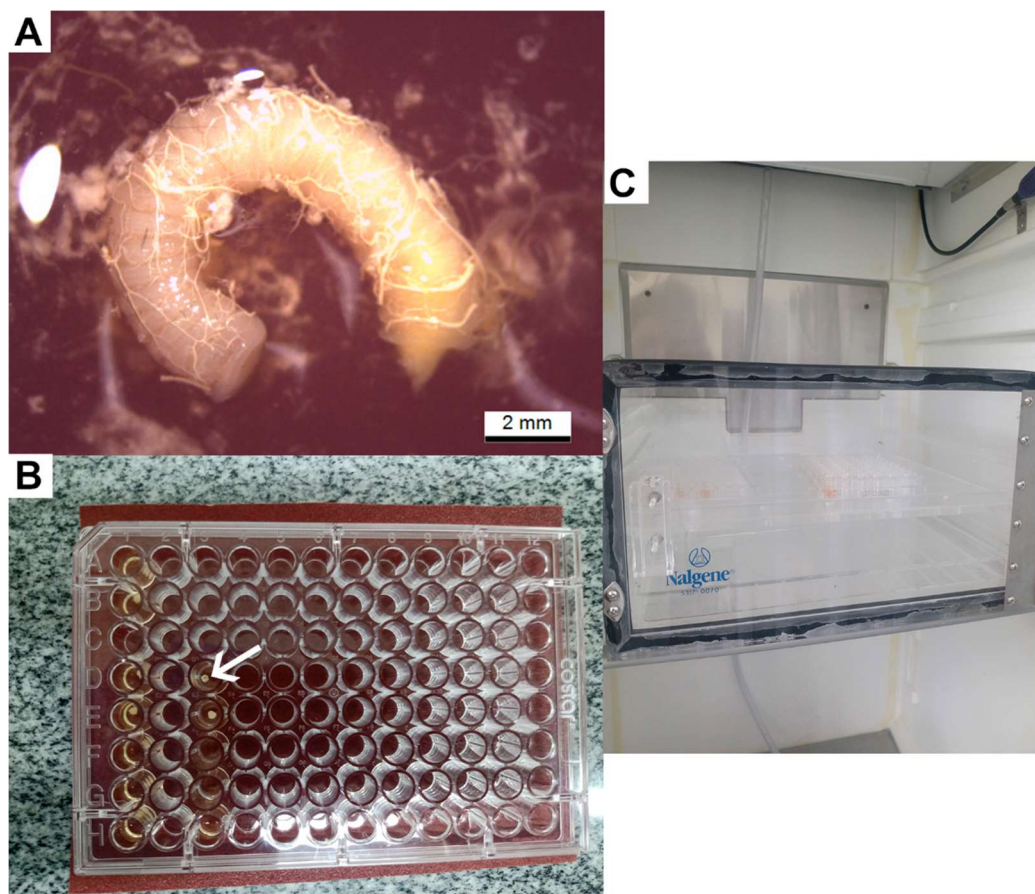
Os fragmentos adquiridos após a dissecação do intestino médio foram colocados individualmente em uma placa de cultivo celular de 48 poços (figura 1 – B). Dos 6 fragmentos, 3 foram colocados em poços contendo 100  $\mu$ L de meio de cultivo celular (9 mL de meio Leibovitz; 1 mL de meio de suplemento para inseto; 100  $\mu$ L de antibióticos) e 10  $\mu$ L de imidacloprido (50  $\eta$ g/ $\mu$ l), sendo o grupo exposto; e os outros 3 foram colocados em poços contendo apenas o meio de cultivo celular, sendo o grupo controle. Ainda, 3 poços foram designados para o controle negativo, contendo apenas meio de cultivo celular, e outros 3 ficaram vazios. Para cada grupo, foram testados os tempos de 2 horas (*X. frontalis* = 3) e 4 horas de incubação (*X. frontalis* = 3). Segundo Cruz-Landim (2009), na espécie de abelha *Apis mellifera*, o xarope demora de 1 a 2,5 horas para chegar no intestino médio, dependendo da casta, podendo permanecer nesta região por até 6 horas.

Durante a incubação, a placa de cultivo celular contendo os fragmentos permaneceu dentro de uma caixa acrílica hermética (Nalgene), a qual foi alocada em estufa B.O.D. (28°C  $\pm$  1°C, 70%  $\pm$  10% de umidade) (figura 1 – C).

Após as 2 e 4 horas estabelecidas, foram adicionados 200  $\mu$ L do reagente CellTiter-Glo® 3D Cell Viability Assay nos poços, exceto nos vazios, e a placa foi transferida para o equipamento luminômetro para leitura da viabilidade celular, sendo que as células vivas liberam ATP que é detectado e quantificado (concentração) pelo equipamento.

Para verificar a morfologia dos fragmentos do intestino médio após os tempos de incubação, sem agrotóxico, foram incubados 3 fragmentos por 2 horas e 3 fragmentos por 4 horas. Os fragmentos foram processados para inclusão em resina histológica e microtomia (micrótomo Leica RM2255). As secções adquiridas foram coradas com Hematoxilina e Eosina para observação ao microscópio óptico de campo claro (Olympus SC30) e fotodocumentação (Software Olympus cellSens Entry 1.14)

Figura 1 – Procedimentos para a obtenção e incubação dos fragmentos da porção mediana do intestino médio de *X. frontalis*. A) Porção mediana do intestino médio dissecada. B) Placa de cultivo celular, contendo poços com fragmentos (seta). C) Caixa hermética na estufa BOD.



Fonte: elaborado pela autora.

A leitura da placa de cultivo celular no luminômetro mostrou que as células permaneceram viáveis nos tempos de 2 e 4 horas, expostas ou não ao imidacloprido (tabela 1).

Tabela 1 – Número de células viáveis após 2 e 4 horas de incubação nos respectivos grupos: exposto (fragmento, 100 µL de meio de cultivo celular e 10 µL de imidacloprido na concentração de 50 ng/µl) e controle (fragmento e meio de cultivo celular). Os poços designados para o controle negativo foram preenchidos apenas com meio de cultivo celular. O número de células viáveis também está representado pelo espectro de cores, indo do vermelho (mais células viáveis) ao lilás (menos células viáveis).

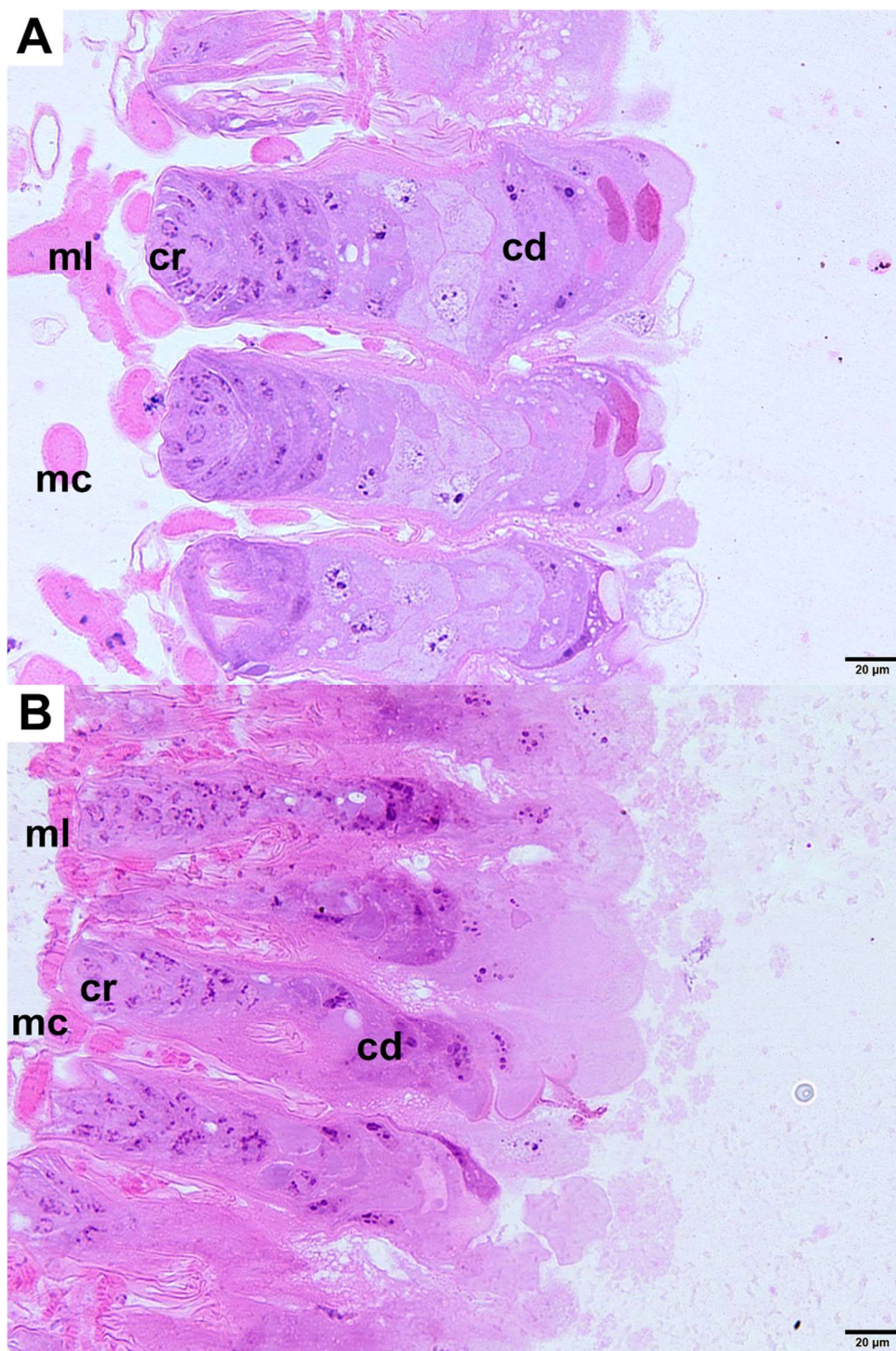
2 horas												
	Exposto			Controle +			Controle -			Vazio		
Abelha 1	2,19E+06	2,61E+06	1,24E+06	2,08E+06	4,25E+06	8,57E+05	1,63E+03	3,93E+02	3,43E+02	1,00E+01	3,00E+00	7,40E+02
Abelha 2	6,84E+05	6,63E+05	9,25E+05	8,49E+05	1,43E+06	4,73E+06	2,99E+03	9,46E+02	6,43E+02	0,00E+00	6,00E+00	7,33E+02
Abelha 3	6,60E+05	2,39E+05	1,16E+06	5,31E+04	7,62E+04	8,47E+05	1,33E+03	6,80E+02	8,40E+02	6,00E+00	3,00E+00	3,86E+02
4 horas												
	Exposto			Controle +			Controle -			Vazio		
Abelha 1	5,35E+05	1,27E+06	4,56E+06	1,60E+05	3,98E+05	3,34E+05	2,85E+03	2,41E+03	3,11E+03	6,00E+00	1,30E+01	6,10E+02
Abelha 2	2,63E+05	1,12E+05	2,24E+05	1,15E+05	8,16E+04	3,21E+05	2,97E+04	2,65E+03	3,02E+03	1,30E+01	6,00E+00	5,20E+02
Abelha 3	2,82E+05	2,65E+05	3,48E+05	5,91E+05	2,28E+05	2,89E+05	3,92E+03	3,38E+03	3,33E+03	1,00E+01	6,00E+00	1,76E+02

Fonte: elaborado pela autora.

A análise histológica dos fragmentos incubados apenas com meio de cultivo corrobora a leitura da placa no luminômetro, pois o órgão exibiu, em ambos os tempos, organização tecidual íntegra, estando as camadas de músculo longitudinal e circular posicionadas externamente, os ninhos de células regenerativas na base do epitélio com as células digestivas acima, estendendo-se em direção ao lúmen (figura 2).

Contudo, a comparação do número de células viáveis entre os grupos exposto e controle positivo não foi possível, pois é necessário padronizar o número de células por fragmento (microtecido) cultivadas em cada grupo.

Figura 2 – Secções longitudinais de fragmentos da porção mediana do intestino médio de *X. frontalis* incubados com meio de cultivo celular. Coloração: HE. A) Epitélio intestinal após 2 horas de cultivo *in vitro*. Magnificação: 400x. Escala: 20  $\mu$ m. B) Epitélio intestinal após 4 horas de cultivo *in vitro*. Magnificação: 400x. Escala: 20  $\mu$ m.



Fonte: elaborado pela autora.

ml: músculo longitudinal; mc: músculo circular; cr: células regenerativas; cd: células digestivas.

## REFERÊNCIAS

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

**ANEXO – A****Mudança do título da tese**

Universidade Federal de São Carlos  
Campus Sorocaba  
Rodovia João Leme dos Santos (SP 264) Km 110  
Bairro Itinga – Sorocaba – São Paulo – Brasil  
CEP 18052-780 – Fone: (15) 3229.5940 (DBio)

---

Prezado Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla,  
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Venho por meio desta solicitar a mudança de título do projeto de doutorado "Criação *in vitro* de *Xylocopa* (Hymenoptera, Apidae, Xylocopini) para avaliação dos efeitos neurotóxicos de doses subletais de imidacloprido em imaturos" da aluna Kyl Assaf, R.A. 28610164 e CPF 368.917.848-75.

A solicitação de mudança deve-se ao fato de que a coleta de imaturos não pôde ser realizada, pois os bambus disponibilizados para a nidificação das abelhas não foram nidificados. Sendo assim, a pesquisa será realizada com abelhas fêmeas adultas coletadas em atividade de vôo nas flores. Além disso, os objetivos gerais e específicos foram reorganizados, incluindo-se a caracterização do intestino médio em adição a do cérebro, bem como sua ultraestrutura, já que verificamos que o intestino médio das abelhas do gênero *Xylocopa* tem características histológicas diferentes daquelas descritas para a espécie modelo *Apis mellifera*. Também, será feita uma avaliação da viabilidade das células intestinais após exposição ao imidacloprido em condições *in vitro*, por meio do equipamento luminômetro adquirido no projeto temático da Fapesp. Portanto, o novo título será: "Caracterização morfológica do cérebro e do intestino médio de abelhas do gênero *Xylocopa* para avaliação dos efeitos da exposição ao imidacloprido".

Permaneço à disposição para esclarecimentos adicionais que se façam necessários.

Atenciosamente,

Elaine Cristina Mathias da Silva

Documento assinado digitalmente  
 ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA  
Data: 11/08/2023 05:12:51-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Kyl Assaf

Documento assinado digitalmente  
 KYL ASSAF  
Data: 12/08/2023 11:47:11-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>