

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

RAFAELA TADEI

**EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE AGROTÓXICOS E DO PATÓGENO *Nosema ceranae* NO DESENVOLVIMENTO DE *Apis mellifera* africanizada**

Sorocaba  
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

RAFAELA TADEI

**EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE AGROTÓXICOS E DO PATÓGENO *Nosema ceranae* NO DESENVOLVIMENTO DE *Apis mellifera* africanizada**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento ambiental, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento ambiental

Orientação: Prof. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Sorocaba  
2020

Tadei, Rafaela

EFEITOS DA COMBINAÇÃO DE AGROTÓXICOS E DO PATÓGENO  
Nosema ceranae NO DESENVOLVIMENTO DE Apis mellifera africanizada /  
Rafaela Tadei. -- 2020.  
130 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus  
Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Banca examinadora: Elaine C. M. Silva-Zacarin; Fábio Carmago Abdalla;  
Osmar Malaspina

Bibliografia

1. Abelha. 2. Agrotóxicos. 3. Efeitos sub-letais. I. Orientador. II.  
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) 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**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Rafaela Tadei, realizada em 03/03/2020:

*Elaine C. M. Silva Zacarin*

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin  
UFSCar

---

Prof. Dr. Osmar Malaspina  
UNESP

*Fabio Camargo Abdalla*

Prof. Dr. Fábio Camargo Abdalla  
UFSCar

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Osmar Malaspina e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

*Elaine C. M. Silva Zacarin*

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

## AGRADECIMENTO

Agradeço, inicialmente a Deus, pois acredito que tudo nessa vida acontece com um propósito e sou muita grata a Ele por todas as oportunidades que tive até aqui e por todas as pessoas que conheci durante esse trajeto, o qual não seria o mesmo se não fossem essas pessoas:

Meus pais Roselaine e Mauricio, meus irmãos Michele e Vinícius e minha avó Luzia, que me cercaram de amor e apoio durante esses anos, que incentivaram mesmo sem entender muitas vezes o caminho acadêmico;

A minha orientadora e amiga Elaine Zacarin que foi luz, inspiração, verdadeira professora e orientadora, líder e exemplo em cada fase, fazendo o possível e até mesmo o que eu acreditava ser impossível para desempenhar muito mais do que seria a sua função. A essa mulher forte e incrível eu não tenho palavras para expressar a gratidão;

Ao Wesley que foi meu suporte para cada dificuldade, que acreditou e foi um grande motivador nos momentos que eu precisei sonhar mais alto do que eu conseguia naquele momento. Obrigada também pelos dias que um filosofo entrava na onda das práticas laboratoriais para terminar os testes;

Aos meus amigos que sonharam, pensaram e colocaram a mão na massa comigo, em especial à toda equipe do NuPECA que não foram só companheiros de laboratório, mas verdadeiros amigos: Cris (Cristiane), Josi (Josimere), Hellen, Caio, Mo (Monique) e Van (Vanessa). Vocês fizeram diferença na minha vida, não só para os resultados desse trabalho, mas na minha formação como pesquisadora, como pessoa. Obrigada mesmo por todas as vezes que ficávamos horas e horas bolando projetos, discutindo teorias e nossas opções de futuro, nesses momentos eu só me apaixonava mais pela ciência. E claro, por todos nossos momentos de descontrações, discussões políticas e partilha de comida. Vocês são incríveis, marcaram minha história e entraram no meu coração;

A todos os professores que contribuíram para minha formação profissional, técnicos e terceirizados que participaram desses dois anos, em especial à professora Mônica Jones e professor Aparecido Junior Menezes;

Ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento ambiental e à todas as pessoas envolvidas nele;

Ao Laboratório de diversidade vegetal (LADIVE) e Departamento de biologia pelo suporte com infraestrutura;

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES;

Ao apicultor Edson Sampaio que sempre nos ajudou com as coletas de abelhas e suporte para realização dos bioensaios;

A todos que participaram direta ou indiretamente, meu muito obrigada.

## RESUMO

TADEI, Rafaela. Efeitos da combinação de agrotóxicos e do patógeno *Nosema ceranae* no desenvolvimento de *Apis mellifera* africanizada. 2020. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e monitoramento ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2020.

Populações de abelhas vêm sofrendo declínio em diversas partes do mundo, possivelmente devido à uma combinação de fatores bióticos e abióticos, como agrotóxicos, patógenos e fragmentação florestal. Desde a fase larval, as abelhas são expostas a combinações de agrotóxicos pela alimentação e por contato que podem prejudicar sua saúde e a capacidade de combater de patógenos, como o microsporídio *Nosema ceranae*. O presente estudo teve como objetivo avaliar se a exposição à combinação de agrotóxicos na fase inicial do desenvolvimento da abelha altera as taxas de infecção e efeitos causados pelo patógeno *N. ceranae*. Para isso, larvas de *Apis mellifera* provenientes de três colônias saudáveis foram transferidas para condições *in vitro* e receberam dieta artificial contendo 2% de agrotóxico do terceiro ao sexto dia de alimentação. O bioensaio larval foi composto por seis grupos experimentais: I – Controle, II – Controle solvente, III – Inseticida clotianidina, IV – Fungicida piraclostrobina, V – Combinação: inseticida + fungicida, VI – Fungicida piraclostrobina comercial - Comet®. O consumo total de clotianidina e piraclostrobina foi de 0,17 ng/larva e 0,69 ng/larva, respectivamente. Esses indivíduos foram mantidos a 34°C e umidade controlada até a emergência. Após um dia da emergência, metade dos indivíduos de cada grupo experimental foi inoculado oralmente com 100.000 esporos de *N. ceranae*. Seis dias após a inoculação, o intestino médio das abelhas foi submetido a dissecação, fixação e microtomia para avaliação histológica, histoquímica e de imunofluorescência. A partir dos cortes histológicos foram realizadas análises quantitativas da taxa de infecção, morfométricas da espessura do epitélio e semi-quantitativas das alterações celulares no intestino médio. Efeitos deletérios no desenvolvimento pós-embrionário não foram observados nos grupos experimentais. A exposição larval aos agrotóxicos tornou os adultos subsequentes mais susceptíveis às ações do patógeno *Nosema ceranae*, aumentando as lesões epiteliais no intestino médio. Dentre os grupos experimentais, o inseticida apresentou a maior citotoxicidade ao intestino médio e aumentou as taxas de infecção celular aos esporos inoculados. Não foi observado sinergismo nos indivíduos expostos a combinação de agrotóxicos, porém a co-exposição favoreceu a infecção ao patógeno. A formulação comercial do fungicida não potencializou os efeitos do princípio ativo no epitélio ventricular das abelhas adultas. Desse modo, esse estudo é o primeiro a avaliar a exposição larval a combinações de agrotóxicos seguida da inoculação com *N. ceranae* e mostrou que a exposição larval a doses subletais destes agrotóxicos podem afetar a saúde dos indivíduos adultos subsequentes.

Palavras-chave: Abelha. Neonicotinóide. Fungicida. Desenvolvimento larval.

## ABSTRACT

TADEI, Rafaela. Effects of the combination of pesticides and the pathogen *Nosema ceranae* on the development of africanized *Apis mellifera*. 2020. 130 p. Dissertation (Master in Biotechnology and Environmental Monitoring) - Federal University of São Carlos, *campus* Sorocaba, Sorocaba, 2020.

Bee populations have declined in several parts of the world, possibly due to a combination of biotic and abiotic factors, such as pesticides, pathogens and forest fragmentation. Since the larval stage, bees are exposed to combination of pesticides by food and contact that can harm their health and capacity to combating pathogens, such as the microsporidium *Nosema ceranae*. The present study aimed to assess whether exposure to the combination of pesticides in the early stage of bee development changes the rates of infection and effects caused by the pathogen *N. ceranae*. For this, *Apis mellifera* larvae from three healthy colonies were transferred to *in vitro* conditions and received an artificial diet containing 2% of pesticides from the third to the sixth day of feeding. The larval bioassay was composed of six experimental groups: I - Control, II - Solvent control, III - Clothianidin insecticide, IV - Pyraclostrobin fungicide, V - Combination: insecticide + fungicide, VI - Commercial pyraclostrobin fungicide - Comet®. The total consumption of clothianidin and pyraclostrobin was 0.17 ng / larva and 0.69 ng / larva, respectively. These individuals were kept at 34°C and humidity controlled until the emergency. One day after the emergency, half of the individuals in each experimental group were orally inoculated with 100,000 *N. ceranae* spores. Six days after inoculation, the midgut of the bees was submitted to dissection, fixation and microtomy for histological, histochemical and immunofluorescence evaluation. From the histological sections, quantitative analyzes of the infection rate, morphometric of the epithelial thickness and semi-quantitative analyzes of cellular changes in the midgut were performed. Deleterious effects on post-embryonic development were not observed in the experimental groups. Larval exposure to pesticides made subsequent adults more susceptible to the actions of the pathogen *Nosema ceranae*, increasing epithelial lesions in the midgut. Among the experimental groups, the insecticide showed the highest cytotoxicity to the midgut and increased the rates of cellular infection to the inoculated spores. No synergism was observed in individuals exposed to a combination of pesticides, but co-exposure favored infection with the pathogen. The commercial formulation of the fungicide did not enhance the effects of the active principle on the ventricular epithelium of adult bees. Thus, this study is the first to assess larval exposure to combinations of pesticides followed by inoculation with *N. ceranae* and showed that larval exposure to sublethal doses of these pesticides can affect the health of subsequent adult individuals.

Keywords: Honeybee. Neonicotinoid. Fungicide. Larval development.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1: Introdução e fundamentação teórica

- Figura 1. Estrutura química dos principais inseticidas da classe neonicotinóides..... 18
- Figura 2. Concentrações máximas de inseticidas neonicotinóides encontradas no pólen, abelhas adultas e bee bread em diferentes regiões do mundo..... 18
- Figura 3. Estrutura química do fungicida piraclostrobina pertencente a classe estrobilurina. .... 21
- Figura 4. Concentrações máximas de fungicidas estrobilurinas encontradas no pólen, abelhas adultas e *bee bread* em diferentes regiões do mundo. .... 22

### CAPÍTULO 2: Artigo 1

- Figura 5. Síntese dos efeitos dos agrotóxicos (neonicotinóides e fungicidas) e do patógeno *Nosema ceranae* em abelhas operárias adultas e hipótese dos efeitos da exposição combinada por esses estressores em diferentes fases do desenvolvimento da abelha. .... 28
- Figura 6. Montagem de cúpulas para transferência das larvas de primeiro instar e acompanhamento do desenvolvimento pós-embriônico.. .... 30
- Figura 7. Delineamento experimental do bioensaio de exposição larval aos agrotóxicos. . 32
- Figura 8. Padrão de contagem de esporos em câmara de Neubauer. .... 34
- Figura 9. Taxa de anomalias observadas durante o desenvolvimento pós-embriônico (média  $\pm$  erro padrão)..... 40
- Figura 10. Curva de sobrevivência e longevidade das abelhas adultas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval. .... 41
- Figura 11. Tempo letal médio (TL 50) de *A. mellifera* africanizada expostas aos agrotóxicos durante a fase larval. .... 41
- Figura 12. Taxa de infecção a partir da análise das abelhas mortas resultantes do bioensaio de infecção (média  $\pm$  erro padrão) ..... 43
- Figura 13. Padrão de infecção celular após seis dias da inoculação com esporos de *Nosema ceranae* no intestino médio de *Apis mellifera* africanizada (média  $\pm$  erro padrão). .... 44
- Figura 14. Fases de desenvolvimento do esporo de *N. ceranae* no epitélio ventricular de abelha..... 45
- Figura 15. Espessura do epitélio ventricular de *Apis mellifera* (média  $\pm$  erro padrão) ..... 46
- Figura 16. Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de baixa importância patológica (média  $\pm$  erro padrão) ..... 47
- Figura 17. Alterações morfológicas observadas no epitélio ventricular de *Apis mellifera* . 47
- Figura 18. Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de importância patológica moderada (média  $\pm$  erro padrão)..... 50
- Figura 19. Alterações estruturais no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* (média  $\pm$  erro padrão) ..... 51
- Figura 20. Correlação de Spearman entre os índices de lesão das alterações morfológicas analisadas no intestino médio de *A. mellifera*..... 52
- Figura 21. Índice total de lesão no intestino médio de *A. mellifera* (média  $\pm$  erro padrão). 53



Figura 26. Técnicas histoquímicas para marcação de proteínas, lipídios e gliconjugados nas alterações morfológicas no epitélio ventricular de abelhas adultas evidenciando vacuolização de degeneração (seta vermelha) e secreção apócrina (seta preta).....	54
Figura 27. Reação de Tunel no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e sem inoculação de esporos de <i>Nosema ceranae</i> na fase adulta .....	55
Figura 28. Reação de Tunel no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e com inoculação de esporos de <i>Nosema ceranae</i> na fase adulta.....	57
Figura 29. Reação de Tunel no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval .....	59

### **CAPITULO 3: Artigo 2**

Figura 31. Média do consumo diário de alimento energético (solução açucarada) e proteico por indivíduo $\pm$ desvio padrão, durante seis dias após a inoculação com esporos de <i>N. ceranae</i> .....	83
Figura 32. Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de baixa importância patológica (média $\pm$ erro padrão) .....	84
Figura 33. Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de importância patológica moderada (média $\pm$ erro padrão).....	85
Figura 34. Fotomicrografias da histologia do intestino médio de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e ao patógeno <i>N. ceranae</i> na fase adulta.....	85
Figura 35. Alterações estruturais no epitélio do intestino médio de <i>A. mellifera</i> (média $\pm$ erro padrão) .....	87
Figura 36. Espessura do epitélio ventricular de <i>Apis mellifera</i> (média $\pm$ erro padrão) .....	88
Figura 37. Padrão de infecção celular após seis dias da inoculação com esporos de <i>Nosema ceranae</i> no intestino médio de <i>Apis mellifera</i> africanizada (média $\pm$ erro padrão) .....	89
Figura 38. Detecção de fragmentação de DNA pela reação de TUNEL no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e sem inoculação de esporos de <i>Nosema ceranae</i> na fase adulta.....	90
Figura 39. Detecção de fragmentação de DNA pela reação de TUNEL no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e com inoculação de esporos de <i>Nosema ceranae</i> na fase adulta.....	91
Figura 40. Intensidade média de marcação específica de HSP70 por imunofluorescência no epitélio ventricular de <i>Apis mellifera</i> .....	92
Figura 41. Detecção de imunofluorescência positiva para HSP70 a partir de marcação com anticorpo primário e secundário conjugado ao fluoróforo (vermelho) e sobreposição com DAPI (marcação de núcleos – azul) no epitélio instestinal de <i>A. mellifera</i> africanizada expostas ao fungicida piraclostrobina na fase larval. ....	92
Figura 42. Detecção de imunofluorescência positiva para HSP70 a partir de marcação com anticorpo primário e secundário conjugado ao fluoróforo (vermelho) e sobreposição com DAPI (marcação de núcleos – azul) no epitélio instestinal de <i>A. mellifera</i> africanizada expostas ao fungicida piraclostrobina na fase larval e ao patógeno <i>N. ceranae</i> .....	94

## APENDICE 2

- Figura 22. Epitélio ventricular de abelhas adultas expostas à agrotóxicos durante à fase larval, H.E ..... 120
- Figura 23. Epitélio ventricular de abelhas adultas expostas à agrotóxicos durante à fase larval e infectadas com *Nosema ceranae* após a emergência, H.E ..... 121
- Figura 24. Secção do epitélio ventricular de abelhas adultas expostas à agrotóxicos durante à fase larval ..... 122
- Figura 25. Secção do epitélio ventricular de abelhas adultas expostas à agrotóxicos durante à fase larval e infectadas com *Nosema ceranae* após a emergência ..... 123

## APENDICE 3

- Figura 30. Espectro de FTIR do inseticida clotianidina e do fungicida piraclostrobina (d: dobramento) ..... 124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e volume das dietas oferecidas na fase de alimentação durante o desenvolvimento larval de <i>Apis mellifera</i> .....	29
Tabela 2. Composição de dietas proteicas líquidas e sólidas para alimentação de abelhas adultas (V.p. – valor proteico; % m/m; xarope = solução açucarada à 50% m/m.....	119
Tabela 3. Grupos experimentais após a emergência das abelhas adultas, dose de agrotóxicos e número de esporos ingeridos.....	33
Tabela 4. Parâmetros histológicos qualitativos utilizados para análise semi-quantitativa para determinação de danos no intestino médio de abelhas exposta à estressores e o fator de importância correspondente .....	36
Tabela 5. Parâmetros utilizados para morfometria do intestino e quantificação da taxa de células infectadas pelo esporo de <i>Nosema ceranae</i> .....	37
Tabela 6. Taxas médias da mortalidade relativa e das fases de desenvolvimento durante o período pós-embrionário (média ± erro padrão).....	39
Tabela 7. Estimativa de número de esporos (média e mediana) presentes nas abelhas mortas a partir da contagem em câmara de Neubauer.....	42
Tabela 8. Taxas médias da mortalidade relativa e das fases de desenvolvimento durante o período pós-embrionário (média ± erro padrão).....	81
Tabela 9. Tempo letal médio e probabilidade de sobrevivência de abelhas expostas ao fungicida durante à fase larval.....	82

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 REVISÃO DA LITERATURA .....	11
<b>1.1.1 Relatos do declínio de populações de abelhas e CCD (“Colony Collapse Disorder”)</b> .....	11
<b>1.1.2 Fatores estressores associados ao declínio</b> .....	12
<b>1.1.3 Organismo modelo: <i>Apis mellifera</i></b> .....	14
1.1.3.1 Fase larval.....	14
1.1.3.2 Fase adulta .....	15
<i>1.1.3.2.1 Sistema digestório das abelhas</i> .....	16
<b>1.1.4 Evidências do efeito de inseticidas neonicotinóides em abelhas</b> .....	17
<b>1.1.5 Evidências do efeito de fungicidas estrobilurina em abelhas</b> .....	20
<b>1.1.6 <i>Nosema ceranae</i> em <i>Apis mellifera</i></b> .....	23
<b>2 ARTIGO 1</b> .....	26
2.1 INTRODUÇÃO .....	26
2.2 METODOLOGIA .....	29
2.2.1 Bioensaio larval em condições <i>in vitro</i> .....	29
2.2.2 Exposição larval aos agrotóxicos.....	31
2.2.3 Infecção de abelhas recém-emergidas por <i>Nosema ceranae</i> .....	32
2.2.4 Análise histológica .....	34
2.2.5 Identificação de morte celular .....	38
2.2.6 Análise estatística.....	38
2.3 RESULTADOS .....	39
2.3.1 Exposição aos agrotóxicos.....	39
2.3.2 Infecção com esporos de <i>Nosema ceranae</i> .....	42
2.3.3 Espessura do epitélio ventricular .....	45
2.3.4 Análise histológica e histoquímica .....	46
2.3.4 Reação de Tunel.....	54
2.4 DISCUSSÃO .....	59
2.5 CONCLUSÃO .....	66
REFERÊNCIAS.....	67
<b>3 ARTIGO 2</b> .....	74
3.1 INTRODUÇÃO .....	74
3.2 METODOLOGIA .....	76
3.2.1 Exposição aos agrotóxicos.....	76
3.2.2 Análise histopatológica .....	77
3.2.3 Análise de biomarcadores celulares por imunofluorescência .....	78

3.2.3.1 Reação de TUNEL para imunomarcção de fragmentação de DNA .....	78
3.2.3.2 Detecção de HSP70 por imunofluorescência .....	79
<b>3.2.4 Análise dos dados</b> .....	80
<b>3.3 RESULTADOS</b> .....	81
<b>3.3.1 Exposição aos agrotóxicos</b> .....	81
<b>3.3.2 Análise histopatológica</b> .....	83
<b>3.3.3 Reação de TUNEL</b> .....	89
<b>3.3.4 Quantificação de HSP70</b> .....	91
3.4 DISCUSSÃO .....	94
3.5 CONCLUSÃO .....	99
REFERÊNCIAS.....	99
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	105
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	106
<b>APENDICE 1</b> .....	119
<b>APENDICE 2</b> .....	120
<b>APENDICE 3</b> .....	124
<b>ANEXOS</b> .....	125

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas são insetos polinizadores que desempenham um papel importante na produção de alimentos cultiváveis e na manutenção da biodiversidade (HUNG *et al.*, 2018; LEVIN, 1983). Dentre as abelhas, a *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 é uma espécie generalista, abundante nos ecossistemas, e de fácil manejo, sendo muito utilizada na polinização de plantas cultiváveis, produção de mel e demais produtos apícolas, possuindo grande relevância econômica e ambiental (GARY *et al.*, 1985).

Na última década, países europeus, Brasil e EUA vêm sofrendo com um declínio de populações de abelhas (JOHNSON *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2015; PIRES *et al.*, 2016), afetando tanto o equilíbrio do meio ambiente, como o setor econômico alimentício (CALDERONE, 2012). As evidências ao crescente declínio de populações de abelhas apontam combinações múltiplas de fatores bióticos e abióticos, dentre eles destacam-se os agrotóxicos e os patógenos (GOULSON *et al.*, 2015; NICHOLLS *et al.*, 2017; SIMON-DELSO *et al.*, 2014).

O contato com os agrotóxicos ocorre durante as atividades diárias de coleta de pólen e néctar, realizada pelas abelhas forrageiras, levando esses recursos até a colônia, os quais podem conter resíduos desses xenobióticos. O pólen e néctar são utilizados para produção do alimento que será ingerido pelas abelhas adultas e larvas (BEYER *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2014). Dentre os agrotóxicos frequentemente encontrados no pólen e néctar, estão os inseticidas neonicotinóides e os fungicidas (RAIMETS *et al.*, 2020).

Outro estressor frequente nas colônias de abelhas *A. mellifera* é o patógeno *Nosema ceranae* Fries, 1996, um endoparasita microsporídeo que infecta exclusivamente as células do intestino médio das abelhas, e vem sendo relacionado com prejuízos na sobrevivência de colônias (HIGES *et al.*, 2008). Em abelhas adultas, a infecção por *Nosema* tem múltiplos efeitos em sua saúde (ANTÚNEZ *et al.*, 2009; MAYACK; NATSOPOULOU; MCMAHON, 2015; MAYACK; NAUG, 2009) e no comportamento devido às alterações no polietismo normal das abelhas, ou seja, acelerando de forma prematura a progressão temporal de tarefas que a abelha desempenha conforme sua idade avança (GOBLIRSCH; HUANG; SPIVAK, 2013; HOLT; ARONSTEIN; GROZINGER, 2013; LECOCQ *et al.*, 2016). A infecção por *Nosema* é também conhecida por alterar níveis de uma proteína chave, a vitelogenina, necessária para oviposição em rainhas e para a modulação do polietismo das abelhas operárias (ANTÚNEZ *et al.*, 2009; LECOCQ *et al.*, 2016).

A combinação desses dois estressores, agrotóxicos e *Nosema ceranae*, ainda é pouco compreendida em abelhas, podendo aumentar os impactos por efeitos sinérgicos (ALAUX *et al.*, 2010; DUSSAUBAT *et al.*, 2016) ou não ocorrer sinergismo entre eles (ODEMER *et al.*, 2018). Este é o primeiro estudo que relaciona a exposição aos agrotóxicos durante a fase larval e os efeitos tardios dessa exposição com a infecção do patógeno *N. ceranae* em *A. mellifera* africanizada. A hipótese geral desse trabalho é que a exposição aos agrotóxicos durante a fase larval causa prejuízos na saúde das abelhas adultas, alterando estruturas celulares no intestino médio que influenciam na defesa contra o patógeno natural *N. ceranae*. Desse modo, objetivou-se avaliar os efeitos tardios da exposição larval aos agrotóxicos e sua influência sobre a infecção ao patógeno *N. ceranae* durante a fase adulta em comparação as abelhas não expostas aos agrotóxicos na fase larval.

## 1.1 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1.1 Relatos do declínio de populações de abelhas e CCD (“Colony Collapse Disorder”)

Segundo o levantamento realizado por Underwood e vanEngelsdorp (2007), existem relatos de apicultores nos EUA de grandes perdas de abelhas desde 1869, sendo que ocorreu a intensificação desses relatos a partir de 2006 a 2007 (vanENGELSDORP *et al.*, 2007, 2008). Simultaneamente, outros países da Europa (Croácia, Dinamarca, França, Holanda, Eslovênia e Reino Unido) (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2009), bem como o Canadá, também relataram perdas de abelhas maiores que 20% em seus apiários no inverno de 2007/2008 (PERNAL, 2009).

Nos anos seguintes, os relatos de declínio de populações de abelhas se intensificaram e permanecem até os dias de hoje (BRUCKNER *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2015; SCHMUCK; LEWIS, 2016). Esse declínio populacional afeta o setor econômico, a agricultura (STOKSTAD, 2007) e o ambiente, visto que ele pode estar se estendendo também para outras espécies de abelhas e não apenas na espécie *Apis mellifera* (SPIVAK *et al.*, 2011).

Em *A. mellifera*, sinais e sintomas específicos de declínio das colônias sem causa definida passou a ser reconhecida como uma síndrome denominada “*Colony Collapse Disorder*” (CCD) (UNDERWOOD; vanENGELSDORP, 2007). Alguns dos sinais e sintomas identificáveis que caracterizam a CCD são o rápido enfraquecimento ou morte de abelhas operárias adultas, evidenciada pelo excesso de crias comparada ao número de abelhas adultas; falta de abelhas mortas dentro e ao redor da colmeia, uma vez que estas podem abandonar as

colônias ou não conseguirem retornar para elas (STOKSTAD, 2007; VANENGELSDORP *et al.*, 2009) e invasão posterior das pragas de colmeias (VANENGELSDORP *et al.*, 2009).

Nos países da América Latina há uma escassez de relatos que documentem perdas de colônias de abelhas com sintomas clássicos de CCD (VANDAME; PALACIO, 2010). No Brasil, foram registradas morte de abelhas *A. mellifera* em algumas cidades; entretanto, estes registros não possuem características que os classifique como CCD. As perdas foram associadas com patógenos ou ao uso de agrotóxicos, marcadas pela alta mortalidade de abelhas forrageiras e pela observação de muitas abelhas mortas em volta da colônia. Ainda faltam dados sobre populações de abelhas nativas e um monitoramento que permita contabilizar as perdas de colônias de *A. mellifera* de forma a identificar se o Brasil possui casos de CCD ainda não notificados (PIRES *et al.*, 2016).

A fim de identificar o fator responsável por esses declínios, vanEngelsdorp *et al.* (2009) avaliaram a presença de diferentes estressores (patógenos e presença de agrotóxicos) em colônias saudáveis e com sintomas de CCD. Apesar das colônias com CCD apresentarem uma carga de patógenos maior que as saudáveis, não foi possível identificar um único fator que poderia ser caracterizado como causal para explicar a síndrome. Outros estudos também não identificaram um único estressor causal (CORNMANN *et al.*, 2012; SIMON-DELSO *et al.*, 2014).

Atualmente, acredita-se que o declínio de populações de abelhas ocorre por uma combinação de fatores, causando uma sobrecarga de estresse sobre a colônia (CORNMANN *et al.*, 2012; GOULSON *et al.*, 2015).

### **1.1.2 Fatores estressores associados ao declínio**

As evidências do crescente declínio de populações de abelhas apontam combinações múltiplas de fatores bióticos e abióticos (LONG; KRUPKE, 2016; SPIVAK *et al.*, 2011), incluindo exposição aos agrotóxicos (na fase larval ou na fase adulta); aos patógenos e parasitas; fatores ambientais, como perda e fragmentação de habitats (GOULSON *et al.*, 2015), e restrições nutricionais (DI PASQUALE *et al.*, 2013).

Devido à grande persistência de algumas classes de agrotóxicos no ambiente, seus resíduos são encontrados em diferentes compartimentos, como solo, água, no pólen e néctar das plantas (KRUPKE *et al.*, 2012; LENTOLA *et al.*, 2017; ŠKERL *et al.*, 2009) com os quais as abelhas possuem contato, além da sua presença em diferentes matrizes apícolas, como o mel e



no corpo das abelhas (KILJANEK *et al.*, 2017; PANSERI *et al.*, 2014) e no “*bee bread*” (alimento larval) (SIMON-DELSO *et al.*, 2017).

No estudo de Long e Krupke (2016), resíduos de mais de 30 diferentes agrotóxicos foram encontrados no pólen coletado pelas abelhas (majoritariamente proveniente de plantas da família Fabaceae), sendo os mais frequentes os fungicidas e os herbicidas. Sanchez-Bayo e Goka (2014) encontraram mais de uma centena de resíduos de agrotóxicos em colônias de *A. mellifera*, sendo que os mais frequentes foram os inseticidas neonicotinóides e fungicidas das classes dicarboximida e isoftalonitrila.

Uma análise em diferentes matrizes apícolas (alimento larval, cera, abelhas e mel) realizada por Pohorecka *et al.* (2017), encontrou maior proporção de amostras positivas aos resíduos de agrotóxicos no “*bee bread*” comparada às demais matrizes (60,2% das amostras estavam contaminadas). Apesar da maioria dos agrotóxicos desses estudos terem sido encontrados em concentrações baixas, ou seja, abaixo da concentração considerada letal para as abelhas, estes insetos têm contato diário com uma grande diversidade de químicos, que podem se acumular no corpo do inseto (YANG *et al.*, 2012), atingindo concentrações deletérias.

O contato das abelhas com os agrotóxicos ocorre principalmente pelas atividades diárias de coleta de pólen, néctar e contato com a superfície de plantas. O pólen e néctar coletados são usados para preparo do alimento larval, que é oferecido nos seis primeiros dias do desenvolvimento pós-embrionário (CHARPENTIER *et al.*, 2014; HERBERT JR *et al.*, 1978). Devido à estrutura social das abelhas, os agrotóxicos são levados pelas abelhas forrageiras para a colmeia, causando uma cascata de contaminação intra-colonial, incluindo os indivíduos na fase larval (ZHU *et al.*, 2014).

Dentre os insetos, as abelhas possuem um déficit de aproximadamente metade da quantidade de enzimas de biotransformação que realizam a desintoxicação, o que aumenta a sensibilidade das abelhas aos agrotóxicos e a infecções por patógenos (CLAUDIANOS *et al.*, 2006; WU; ANELLI; SHEPPARD, 2011). O contato de abelhas com fungicidas (CAMPBELL *et al.*, 2016; MULLIN *et al.*, 2016; SIMON-DELSO *et al.*, 2014), inseticidas (BRANDT *et al.*, 2016; ZALUSKI; JUSTULIN; ORSI, 2017) e/ou herbicidas (COUSIN *et al.*, 2013; MAO; SCHULER; BERENBAUM, 2017) foi responsável por efeitos deletérios a nível celular, molecular e comportamental nos indivíduos adultos e foram relacionados com o declínio de populações de abelhas; no entanto, essa relação ainda está sendo estudada para abranger todas as classes de agrotóxicos mais utilizadas e suas variadas combinações.

O efeito de patógenos e parasitas de abelhas como estressores vem sendo estudado. As evidências sugerem que este fator estressor isolado não possui efeito causal na mortalidade de

populações de abelhas, mas quando este estressor está em combinação com a exposição das abelhas aos agrotóxicos o potencial de propagação de tais patógenos é facilitado (FINE; COX-FOSTER; MULLIN, 2017; PRISCO *et al.*, 2013). Simon-Delso *et al.* (2014) estudou o efeito de cinco vírus frequentes em abelhas (Vírus da Célula de Rainha Negra - BQCV, Vírus da Paralisia Crônica da Abelha - CBPV, Vírus da Paralisia Aguda da Abelha - ABPV, Vírus das Asas Deformadas - DWV e Vírus da Cria Ensacada - SBV) e demonstraram que eles não foram determinantes no aparecimento de distúrbios nas colônias de abelhas.

Contudo, alguns estudos em nível de colônia sugerem que os agrotóxicos não levam ao declínio das populações (STERK *et al.*, 2016), mas possivelmente o parasita *Varroa*, o patógeno *Nosema* ou a presença de vírus seja a causa mais provável da CCD (DAINAT *et al.*, 2012; ODEMER *et al.*, 2018; ROLKE *et al.*, 2016; SIEDE *et al.*, 2018; ZEE *et al.*, 2015). Logo, essas informações ainda são contraditórias no meio científico (COULON *et al.*, 2018), pois há estudos que sugerem maior potencial deletério dos agrotóxicos frente aos patógenos (BÖHME *et al.*, 2017; TSVETKOV *et al.*, 2017). Os efeitos do patógeno emergente *Nosema ceranae* serão discutidos no tópico 1.1.6.

### **1.1.3 Organismo modelo: *Apis mellifera***

#### 1.1.3.1 Fase larval

Após três dias da oviposição realizada pela abelha rainha, as larvas de abelhas operárias eclodem e iniciam a fase de alimentação intensa, com duração de cinco dias em *A. mellifera* africanizada e de seis dias na europeia (MICHELETTE; SOARES, 1993). Todos os resíduos metabólicos são armazenados na larva até o último estágio larval (5º instar), quando defecam e eliminam os excretas (ZHU *et al.*, 2014). Após a fase de alimentação, a célula do favo de cria é operculada pelas abelhas operárias, etapa chamada de “cria fechada”. No final da metamorfose, a abelha adulta emerge roendo o opérculo de cera.

A alimentação das larvas de operárias consiste de geleia real nos três primeiros dias, seguida, nos outros dias do período larval, de uma mistura de secreção de glândulas mandibulares e hipofaríngeas das abelhas nutridoras, contendo pequena quantidade de pólen e néctar, alimento denominado de “*bee bread*” (BOBIS *et al.*, 2017; KAFTANOGLU; LINKSVAYER; PAGE, 2011; WANG *et al.*, 2016). O consumo de pólen para *A. mellifera* durante toda a fase de alimentação larval é cerca de 5,4 mg (BABENDREIER *et al.*, 2004) e o consumo de néctar de 59,4 mg (RORTAIS *et al.*, 2005).

As larvas possuem um corpo fusiforme, com espiráculos laterais e ficam sobre o alimento depositado nas células de cria; desse modo, se o alimento estiver contaminado com agrotóxicos, as larvas são expostas a esses contaminantes por via oral e por contato, entrando no indivíduo pelos espiráculos e membranas intersegmentais não esclerotizadas (ZHU *et al.*, 2014). Sua anatomia interna consiste basicamente de um grande tubo digestório, tubos excretores, glândulas secretoras de seda e sistema nervoso (CRUZ-LADIM, 2009). No início da metamorfose, o intestino médio conecta-se ao intestino posterior, sendo marcado pela defecação (FRIOL *et al.*, 2017).

Existem dois protocolos da OECD (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico) que padronizam testes ecotoxicológicos em larvas de *Apis mellifera*, a OECD n° 237, referente à exposição aguda e OECD n° 239, referente à exposição repetida (OECD, 2013, 2016).

#### 1.1.3.2 Fase adulta

As abelhas operárias exercem funções variadas na colônia, dependendo da sua idade, evento chamado de polietismo temporal (JOHNSON, 2010). Abelhas recém-emergidas desempenham funções de limpeza das células dos favos (SEELEY, 1982), permanecendo dentro da colônia devido ao seu desenvolvimento ainda imaturo em relação à falta de capacidade de voar e ferrear (WINSTON, 2003). Dos 4 aos 12 dias de idade passam a desempenhar atividades de alimentação da cria e cuidados com a rainha (SEELEY, 1982), sendo chamadas de operárias nutridoras (JOHNSON, 2010). Em seguida, até os 21 dias de vida, as abelhas, agora chamadas de abelhas de meia-idade, exercem atividades relacionadas a construção e reparo das células de cria, recebimento e processamento do néctar (JOHNSON, 2008). Por fim, as operárias deixam de exercer funções dentro da colônia e iniciam as atividades de forrageamento para coleta de néctar, pólen, própolis e água, sendo denominadas operárias forrageiras (ROBINSON, 1992).

Os fatores conhecidos que modulam esse polietismo são: feromônio mandibular da rainha e o feromônio reprodutivo que podem induzir o aumento da produção de vitelogenina (JOHNSON, 2010), interação entre níveis do hormônio juvenil e da expressão da vitelogenina (alta no corpo gorduroso das abelhas nutridoras e baixa em forrageiras) (AMDAM; OMHOLT, 2003; MESSAN; PAGE; KANG, 2018), expressão de receptores de octopamina e quantidade de octopamina (maior em forrageiras que em nutridoras) (REIM; SCHEINER, 2014).

Devido ao seu hábito generalista e por percorrerem grandes distâncias durante as atividades de forrageio, as abelhas *Apis mellifera* e seus produtos são consideradas bioindicadores para o monitoramento ambiental da contaminação por agrotóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2016; PANSERI *et al.*, 2014). *A. mellifera* é também utilizada na maioria dos estudos ecotoxicológicos como espécie-modelo para estudos com abelhas, apesar de não representar todas as espécies, devido à grande diversidade destes insetos e da falta de dados que mostrem sua representatividade em comparação às outras espécies de abelhas (LIMA *et al.*, 2016), possibilita o início da compreensão de como xenobióticos podem afetar esses polinizadores.

#### 1.1.3.2.1 Sistema digestório das abelhas

O intestino das abelhas pode ser dividido anatomicamente em três regiões: a região anterior, composta pela faringe, esôfago, papo e um proventrículo; a região média, composta pelo ventrículo ou intestino médio; e a região posterior, composta pelo piloro, íleo e pelo reto (CRUZ-LADIM, 2009). A maior parte da digestão e absorção de nutrientes e de outras substâncias químicas ocorre no ventrículo, sendo chamado informalmente como o “estômago funcional” das abelhas (CRUZ-LADIM, 2009; GREGORC; SILVA-ZACARIN; NOCELLI, 2011).

O epitélio do ventrículo é composto por quatro tipos de células, duas prismáticas que se estendem desde a membrana basal até a luz do lúmen, sendo elas as células digestivas e as células do colar da válvula esofágica; e dois tipos de células basais, as células regenerativas (MARTINS *et al.*, 2006) e células endócrinas (RAES; VERBEKE, 1994), que não se estendem até a luz do lúmen e se intercalam entre as células prismáticas (CRUZ-LADIM, 2009). As células digestivas possuem bordo apical estriado sendo responsáveis pela síntese de enzimas digestivas e pela absorção de nutrientes; células endócrinas produzem peptídeos com ação hormonal (MARTINS *et al.*, 2006), como a somatostatina em *A. mellifera* (BOUNIAS; MOREAU; GOURDOUX, 1986), e as células regenerativas formam ninhos na base do epitélio e se diferenciam para substituição de células epiteliais senescentes ou danificadas (CRUZ-LADIM, 2009; FERNANDES *et al.*, 2010).

O interior do ventrículo é envolto por uma membrana peritrófica constituída por uma rede de microfibrilas de quitina, proteínas peritrofinas e carboidratos (SILVA-ZACARIN *et al.*, 2010) onde são liberadas as enzimas digestivas. Essa membrana separa as células epiteliais do alimento presente no lúmen do ventrículo, formando uma região endoperitrófica (localizada no espaço interno à membrana na qual há o alimento) e uma região exoperitrófica (compartimento

entre a membrana peritrófica e as células epiteliais). Além de participar da digestão, essa membrana possui a função de proteção do epitélio contra danos abrasivos e químicos do alimento e age como uma barreira física contra parasitas e bactérias (CRUZ-LADIM, 2009; SILVA-ZACARIN *et al.*, 2010).

A digestão das macromoléculas no ventrículo inicia-se na região endoperitrófica por meio das enzimas digestivas. As moléculas resultantes da digestão inicial vão para o espaço exoperitrófico, ocorrendo a digestão de oligopeptídeos e peptídeos. As substâncias químicas absorvidas pelo ventrículo são transportadas pela hemolinfa (GREGORC; SILVA-ZACARIN; NOCELLI, 2011). Compostos não digeridos são direcionados ao intestino posterior juntamente com a urina primária formada nos túbulos de Malpighi (NOCELLI *et al.*, 2016). O intestino, devido a sua função digestiva e absorviva, é o órgão de primeiro contato com os xenobióticos ingeridos por via oral, como os resíduos de agrotóxicos que podem estar presentes no pólen e néctar.

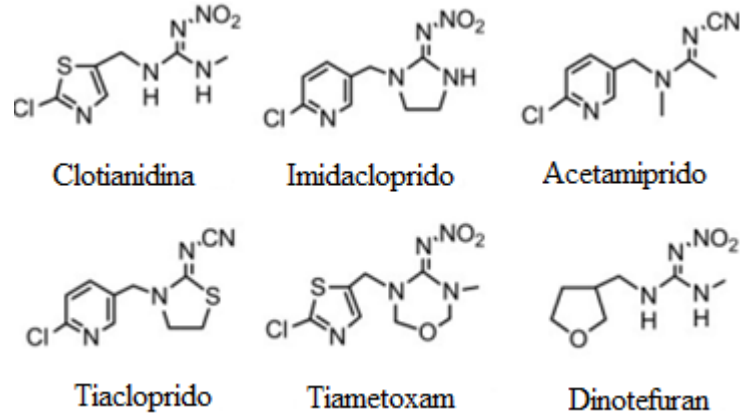
#### **1.1.4 Evidências do efeito de inseticidas neonicotinóides em abelhas**

O primeiro neonicotinóide desenvolvido como inseticida, o imidacloprido, foi lançado na década de 1990. Em seguida, outros neonicotinóides foram desenvolvidos (SILCOX; VITTUM, 2008) e o uso desta classe de agrotóxico expandiu (BUDGE *et al.*, 2015; GOULSON, 2013), Figura 1. O composto mais recentemente incluído ao grupo de inseticidas da classe neonicotinóide foi a clotianidina, descoberta inicialmente como um metabólito do tiametoxam, porém devido ao seu potencial neurotóxico, alta eficiência no combate de pragas e baixa toxicidade para mamíferos, aves e animais aquáticos (UNEME *et al.*, 2006), a clotianidina passou a ser utilizada como agrotóxico (UNEME, 2011). O princípio ativo clotianidina é utilizado na formulação comercial do Inside FS®, Poncho®, com classificações ambientais nível III (mediamente tóxico) e Sumistar® com classificação ambientais nível II (muito perigoso) (MAPA, 2019).

Os neonicotinóides são inseticidas neurotóxicos, persistentes no meio ambiente e de ação sistêmica, sendo aplicados nas folhas ou sementes e então translocados pela seiva da planta até o pólen e néctar (SIMON-DELSO *et al.*, 2014). Estudos vêm relatando a presença de neonicotinóides no pólen e néctar de cultivos agrícolas tratados com formulações comerciais desses inseticidas (Figura 2) (BYRNE *et al.*, 2014; DIVELY; KAMEL, 2012; POHORECKA *et al.*, 2012; SCHMUCK *et al.*, 2001; STONER; EITZER, 2012). Dentre os neonicotinóides identificados em matrizes apícolas, pólen ou néctar destacam-se o tiametoxam, clotianidina,

tiacloprido, imidacloprido e acetamiprido (SCHMUCK; LEWIS, 2016; SILVINA *et al.*, 2017; TSVETKOV *et al.*, 2017).

FIGURA 1. Estrutura química dos principais inseticidas da classe neonicotinóides.



Fonte: UCHIGASHIMA *et al.* (2012)

FIGURA 2. Concentrações máximas de inseticidas neonicotinóides encontradas no pólen, abelhas adultas e *bee bread* em diferentes regiões do mundo.



Fonte: Elaborado pela autora a partir de levantamento bibliográfico utilizando como palavras chaves: *residues*, *pollen*, *bee*, *bee bread*, *residues pesticides*, *neonicotinoid*.

Os neonicotinóides são potencializadores da atividade da acetilcolina (GYÖRI *et al.*, 2017). Especificamente, a clotianidina é um agonista da acetilcolina e compete com ela pelos receptores nicotínicos (nAChRs). A acetilcolinesterase, enzima responsável pela degradação da

acetilcolina, não consegue degradar rapidamente as moléculas de clotianidina. Dessa forma, o impulso nervoso é transmitido continuamente, despolarizando células de Kenyon (neurônios presentes nos corpos pedunculados do cérebro), causando hiperexcitabilidade do sistema nervoso central e morte do inseto (GYŐRI *et al.*, 2017; UNEME *et al.*, 2006).

As abelhas, apesar de possuírem neurônios gustativos da probóscide que são capazes de detectar contaminantes, não detectaram o néctar contaminado com neonicotinóide (KESSLER *et al.*, 2015). Portanto, este recurso floral contaminado não foi repellido pelas abelhas, que o coletaram.

Na avaliação de toxicidade de diferentes agrotóxicos realizada por Iwasa *et al.* (2004), os neonicotinóides foram considerados os mais tóxicos para as abelhas. Mudanças comportamentais e cognitivas em abelhas adultas causadas pela exposição aos neonicotinóides, como dificuldade em retornar para a colônia, danos nas habilidades de memória, orientação e comunicação, tremores e agitação, foram descritos em alguns estudos (ALKASSAB; KIRCHNER, 2018; BORTOLOTTI *et al.*, 2003; DECOURTYE *et al.*, 2004; DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; MENGONI GOÑALONS; FARINA, 2015; ROSSI *et al.*, 2013; SÁNCHEZ-BAYO; BELZUNCES; BONMATIN, 2017; SANTOS *et al.*, 2018; TISON *et al.*, 2019).

Além disso, os neonicotinóides podem aumentar a susceptibilidade de abelhas às infecções por patógenos. A exposição de abelhas à clotianidina afetou a ativação da expressão do gene Dmel\LRR prejudicando a resposta imune do inseto, promovendo a replicação do vírus das asas deformadas nas abelhas (PRISCO *et al.*, 2013). A exposição à nicotina, composto com ação similar aos dos neonicotinóides, aumentou o gasto energético das abelhas em atividades de desintoxicação e atividades metabólicas (RAND *et al.*, 2015), podendo reduzir a energia disponível para a defesa contra a invasão de patógenos. Brandt *et al.* (2016) também evidenciaram que a imunocompetência de abelhas expostas a neonicotinóides (imidacloprido, clotianidina ou tiacloprido), avaliada pela atividade de melanização, resposta de encapsulamento e quantidade de hemócitos na hemolinfa, foi prejudicada.

Contudo, não somente as abelhas adultas são afetadas pelos neonicotinóides, mas também as larvas. Os estudos de agrotóxicos em larvas de *Apis mellifera* representam apenas 3,7% dos estudos envolvendo os efeitos dos agrotóxicos nas abelhas<sup>1</sup>.

Larvas de *A. mellifera* africanizada expostas a doses ambientais de tiametoxam sofreram morte celular precoce em seus lobos ópticos (área associada à visão e orientação) (TAVARES

---

<sup>1</sup> Conforme busca na base “Periódicos CAPES” entre os anos de 1800 a 2019 utilizando as palavras chaves: *honey bee, Apis mellifera larvae, neonicotinoid, larval*.

*et al.*, 2015), bem como distúrbios fisiológicos e redução da sobrevivência larval (TAVARES *et al.*, 2017). Peng e Yang (2016) também encontraram efeitos prejudiciais da exposição larval a doses subletais do neonicotinóide imidacloprido no cérebro, afetando o desenvolvimento de áreas do sistema nervoso responsável pela interpretação das informações visuais e olfativas.

Danos em células digestivas, células dos túbulos de Malpighi, em células de Kenyon do cérebro, foram evidenciados por Friol *et al.* (2017) em abelhas recém-emergidas que tiveram exposição larval ao tiametoxam em concentração 1 µg/L. Pupas e abelhas recém emergidas expostas enquanto larvas a essa mesma concentração de tiametoxam apresentaram redução na frequência de sinapses em estruturas do cérebro envolvidos na recepção de estímulos, aprendizagem e memória (TAVARES *et al.*, 2019). A exposição à clotianidina em larvas apresentou efeitos tardios, reduzindo a longevidade das abelhas após a emergência (TADEI *et al.*, 2019).

Em colônias, a exposição crônica aos resíduos de clotianidina reduziu o comportamento higiênico das abelhas, alterou o comportamento de postura de ovos da abelha rainha e reduziu a sobrevivência de larvas (TSVETKOV *et al.*, 2017). Resíduos de tiacloprido presentes no pólen foram coletados pelas forrageiras e levou a morte de colônias em menos de três anos (BEYER *et al.*, 2018). Entretanto, alguns estudos relataram a ausência de efeitos deletérios em abelhas (*Apis mellifera*) expostas aos neonicotinóides clotianidina e imidacloprido (BAILEY *et al.*, 2005), em colônias expostas à clotianidina (ROLKE *et al.*, 2016) e ao tiametoxam (HERNANDO *et al.*, 2018; PILLING *et al.*, 2013), e em colônias de *Bombus terrestris* Linnaeus, 1758 expostas à clotianidina (STERK *et al.*, 2016).

Apesar desses estudos que demonstram efeitos deletérios causados por neonicotinóides e de estudos que os associem aos declínios de colônias (BUDGE *et al.*, 2015; HENRY *et al.*, 2012), seus efeitos no declínio de populações de abelhas ainda são controversos. Dentre os fatores que tornam esse cenário pouco claro são as crescentes críticas e demandas da comunidade científica por estudos que avaliem os efeitos em colônias, em outras fases de desenvolvimento da abelha e em condições de exposição mais próximas das reais, visto que grande parte dos efeitos deletérios têm sido observados nas operárias adultas.

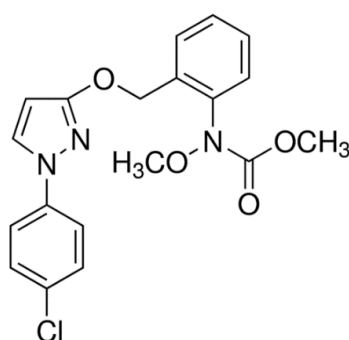
### **1.1.5 Evidências do efeito de fungicidas estrobilurina em abelhas**

Fungicidas do grupo químico estrobilurina foram desenvolvidos a partir de substâncias naturais extraídas de cogumelos do gênero *Strobilurus*. Especificamente, o composto piraclostrobina (Figura 3) foi desenvolvido no ano de 2000 e possui ação protetiva e curativa



nas plantas, ou seja, possui eficácia no início da infecção fúngica, agindo sobre os esporos infectantes e impedindo o crescimento do fungo (BALBA, 2007). Ele possui ação sistêmica, sendo translocado pela seiva da planta para outros locais diferentes do de sua aplicação e é persistente no meio ambiente (ZALUSKI; JUSTULIN; ORSI, 2017), possuindo um tempo de meia vida no solo de 32 dias (ANDRADE *et al.*, 2011). Devido à sua ação sistêmica, resíduos desses fungicidas são encontrados no pólen, néctar de plantas e em outras matrizes apícolas (Figura 4) (LENTOLA *et al.*, 2017; TOSI *et al.*, 2018).

FIGURA 3. Estrutura química do fungicida piraclostrobina pertencente a classe estrobilurina.



Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/pyraclostrobin3878217501318011?lang=pt&region=BR>.  
Data de acesso: 15 set. 2018.

O ingrediente ativo piraclostrobina é utilizado na formulação de 25 fungicidas comerciais, sendo aplicado em folhas de diversas culturas, como algodão, café, batata, soja, feijão, maçã, mamão, manga, melão e melancia. As classificações toxicológicas desses produtos variam de I a III, mas todos possuem uma classificação ambiental de II – produto muito perigoso ao meio ambiente (MAPA, 2019). Outros princípios ativos pertencentes ao grupo estrobilurina são o azoxistrobina, kresoxim-methyl, picoxistrobina, dimoxistrobina, metominostrobin, trifloxistrobina e fluxastrobina (BALBA, 2007).

Os fungicidas estrobilurinas possuem como modo de ação a inibição da respiração mitocondrial do fungo. O composto se liga a um sítio específico na membrana interna da mitocôndria inibindo a quinona oxidase do citocromo b (pertencente ao complexo citocromo bc1). A inibição bloqueia a transferência de elétrons entre o citocromo b e o c1, interrompendo a oxidação do NADH e a síntese do ATP (BALBA, 2007; BARTLETT *et al.*, 2002).

FIGURA 4. Concentrações máximas de fungicidas estrobilurinas encontradas no pólen, abelhas adultas e *bee bread* em diferentes regiões do mundo.



Fonte: Elaborado pela autora a partir de levantamento bibliográfico utilizando como palavras chaves: residues, pollen, bee, bee bread, residues pesticides, fungicide.

Atualmente existem poucos estudos avaliando os efeitos de fungicidas nas abelhas. Domingues *et al.* (2017) observaram que o picoxistrobina reduziu a longevidade e ativou o sistema hepato-nefrocítico em abelhas adultas. Outros estudos relacionaram o piraclostrobina isolado e combinado com inseticidas com alterações comportamentais (TADEI *et al.*, 2019; TARNO; WICAKSONO; BEGLIOMINI, 2018) e com danos celulares em glândulas hipofaríngeas (ZALUSKI; JUSTULIN; ORSI, 2017). Esse mesmo princípio ativo em combinação com o fungicida boscalide causou desorientação das operárias forrageiras e reduziu a nidificação de abelhas solitárias (ARTZ; PITTS-SINGER, 2015), reduziu o consumo de pólen (DEGRANDI-HOFFMAN *et al.*, 2015), inibiu a atividade de mitocôndrias isoladas *in vitro* de *Apis mellifera* quando aplicado em concentrações acima de 5 ppm (CAMPBELL *et al.*, 2016) e reduziu a emergência de rainhas quando larvas foram alimentadas com doses subletais (DEGRANDI-HOFFMAN; CHEN; SIMONDS, 2013).

Os fungicidas também podem afetar a saúde das colônias por alterarem a taxa de infecção de patógenos. No estudo de Pettis *et al.* (2013) o piraclostrobina e o fungicida clorotalonil aumentaram a susceptibilidade à infecção intestinal por esporos de *Nosema*, conforme os níveis desses fungicidas aumentaram na dieta polínica das abelhas.

### 1.1.6 *Nosema ceranae* em *Apis mellifera*

O microsporídio endoparasita *Nosema ceranae* foi caracterizado inicialmente como patógeno natural em *Apis cerana* Fabricius, 1793 (FRIES *et al.*, 1996), mas dez anos depois de sua caracterização foi observado que este patógeno também infecta a abelha *Apis mellifera* (FRIES *et al.*, 2006; PAXTON *et al.*, 2007). Porém, evidências sugerem que as abelhas dessa espécie já conviviam com esse patógeno desde 1998 (PAXTON *et al.*, 2007). A infecção ao microsporídio reduz a saúde das abelhas e, conseqüentemente, a sobrevivência das colônias, contribuindo possivelmente para a perda global das colônias de abelhas (HIGES *et al.*, 2008), porém essa relação ainda é controversa (RETSCHNIG *et al.*, 2015).

Após a detecção de *Nosema ceranae* em *A. mellifera* europeia (FRIES *et al.*, 2006), pesquisadores buscaram entender os efeitos deste patógeno nas abelhas e suas diferenças com a outra espécie de microsporídio *Nosema apis* Zander, 1909, descrita anteriormente como causadora de nosemose (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

*N. ceranae* são fungos altamente especializados (ADL *et al.*, 2005) que parasitam exclusivamente as células epiteliais do intestino médio de *Apis mellifera* (FRIES *et al.*, 2006; MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009), induzindo a degeneração do epitélio digestório e absorptivo do intestino médio (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011), prejudicam a renovação do epitélio intestinal e a homeostase do intestino (PANEK *et al.*, 2018). A partir de experimentos de infecção de abelhas adultas, pôde-se observar que *N. ceranae* é mais patogênica que *N. apis* (HIGES *et al.*, 2007), apresentando maiores índices de infecção e número de esporos durante os dias iniciais de infecção. Diferentemente da *N. apis*, a *N. ceranae* se adapta melhor em temperaturas mais altas, tendo pico máximo de infecção a 33°C (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009).

A infecção inicia-se quando esporos infectantes de *N. ceranae* chegam ao intestino médio da abelha e germinam nas células epiteliais por meio da eversão de um filamento polar na membrana celular liberando esporoplasma na célula hospedeira (FRIES *et al.*, 1996; GISDER *et al.*, 2011) no primeiro dia de exposição (HIGES *et al.*, 2007). O ciclo de vida de *Nosema* é dividido entre fase proliferativa (merogonia) e fase esporogônica (GISDER *et al.*, 2011). Após a germinação, a estrutura vegetativa inicial (meronte fusiforme) se multiplica e, após 48 a 72 horas, a infecção se estabelece no epitélio do ventrículo, sendo observados esporos em diferentes fases do ciclo de desenvolvimento (GISDER *et al.*, 2011; HIGES *et al.*, 2007). A progressão da infecção ocorre pela infecção de células vizinhas por meio da transmissão

horizontal, evidenciada por Higes *et al.* (2007), que constatou a presença de esporos vazios no epitélio em *Apis mellifera*.

Em uma avaliação da saúde de colônias expostas a fatores estressores, apenas a *Nosema ceranae* foi observada como um fator determinante para o declínio do número de abelhas nas colônias (HIGES *et al.*, 2009). Entretanto, a presença de *Nosema* não define necessariamente a saúde da colônia. A nosemose causada por *N. ceranae* é caracterizada por quatro fases, a primeira assintomática; a segunda denominada de fase de substituição, na qual aparecem alterações comportamentais nos indivíduos da colônia, como a postura de ovos no inverno; a terceira fase é caracterizada pelo aumento da quantidade de operárias forrageiras, sendo chamada de “falsa recuperação” e, por fim, na última fase, há uma alta porcentagem de abelhas infectadas dentro da colônia e a rainha é encontrada morta (HIGES *et al.*, 2008). Outros estudos mostraram que *N. ceranae* não é um fator causal para o declínio de populações de abelhas, mas pode estar envolvido em combinação com outros fatores estressores (TRAVER *et al.*, 2018; VANENGELSDORP *et al.*, 2009).

Na colônia, a presença de abelhas com infecções inferiores a 1.000.000 de esporos não é suficiente para apresentar sintomas visíveis de infecção (HIGES *et al.*, 2008). Assim, mesmo que seja assintomática para colônia (MEANA; MARTÍN-HERNÁNDEZ; HIGES, 2010), abelhas podem possuir altas cargas de esporos e prejudicar a aptidão individual da abelha, como o aprendizado (PIIROINEN; GOULSON, 2016).

A infecção ocorre pela ingestão de esporos presentes no alimento, via oral por trofalaxia, via fecal (SMITH, 2012), ou depois da limpeza dos pelos do corpo (OIE, 2018). A exposição de abelhas recém emergidas ao alimento contaminado com esporos de *N. ceranae* pode levar ao aumento da mortalidade diária de adultos (GOBLIRSCH; HUANG; SPIVAK, 2013), modificar os níveis de vitelogenina, interferindo na regulação da expressão idade-específica do comportamento das abelhas (GOBLIRSCH; HUANG; SPIVAK, 2013; LECOCQ *et al.*, 2016) e na oviposição das rainhas (ALAUX *et al.*, 2011). O patógeno também altera a via da octopamina (via fisiológica que responde ao estresse energético) responsável por modular a divisão do trabalho, comportamento de dança, que informa a distância e a localização exata de uma fonte de alimento, e de forrageio (MAYACK; NATSOPOULOU; MCMAHON, 2015). Dessa forma a infecção por *Nosema* foi relacionada às alterações comportamentais e ao forrageio precoce de abelhas (GAGE *et al.*, 2018).

Outros efeitos associados à infecção por *Nosema* são o estresse energético (KURZE *et al.*, 2016; MAYACK; NAUG, 2009), enfraquecimento do sistema imune (ANTÚNEZ *et al.*, 2009), aumento do consumo das reservas de lipídio, redução do tempo de vida (LI; CHEN;

COOK, 2018), e inibição da apoptose no epitélio intestinal da abelha como uma estratégia de sobrevivência do microsporídio que completará seu ciclo no interior das células digestivas (HIGES *et al.*, 2013; KURZE *et al.*, 2018), possivelmente pelo aumento da transcrição do gene da proteína-(iap)-2 inibidora da apoptose (KURZE *et al.*, 2015).

A reprodução e a infecção por *N. ceranae* ocorrem no intestino médio das abelhas infectadas (HUANG; SOLTER, 2013), porém esporos já foram detectados em soluções de órgãos macerados, dentre eles os túbulos de Malpighi, glândulas hipofaríngeas, glândulas salivares e corpo gorduroso (CHEN *et al.*, 2009; GISDER *et al.*, 2010), no pólen corbicular (HIGES *et al.*, 2008) e na geleia real (TRAVER; FELL, 2012), indicando que os esporos podem chegar até as larvas através do consumo do “bee bread”.

Recentemente, dois estudos demonstraram que larvas de *A. mellifera* europeia criadas *in vitro* podem ser infectadas (BENVAU; NIEH, 2017; EIRI *et al.*, 2015). Eiri *et al.* (2015) observaram que os esporos de *Nosema* desenvolveram-se intracelularmente em células do intestino médio no estágio de pré-pupa, e levaram a redução da longevidade do adulto. Outro efeito tardio, observado nas abelhas adultas infectadas na fase larval, foi o aumento de vitelogenina, que pode atrasar o polietismo normal e perturbar o equilíbrio das colônias (BENVAU; NIEH, 2017). O número de esporos e frequência da infecção por *N. ceranae* em larvas ainda não são conhecidos.

Os efeitos fisiológicos da infecção em larvas e adultos, as vias apoptóticas afetadas e o esclarecimento dos efeitos desse patógeno na dinâmica da colônia ainda são poucos conhecidos (BENVAU; NIEH, 2017; EIRI *et al.*, 2015; GREGORC *et al.*, 2016; MAYACK; NATSOPOULOU; MCMAHON, 2015; ODEMER *et al.*, 2018; RETSCHNIG *et al.*, 2015).

## 2 ARTIGO 1

### **Efeito de um neonicotinóide e sua combinação com fungicida no desenvolvimento de *Apis mellifera* africanizada e sua influência na infecção por *Nosema ceranae* nos adultos emergentes**

Effect of a neonicotinoid and its combination with fungicide on the development of *Apis mellifera* africanized and its influence on *Nosema ceranae* infection in emerging adults

#### Resumo

Resíduos de inseticidas neonicotinóides e fungicidas são comumente encontrados no pólen e néctar coletado pelas abelhas. A exposição a esses agrotóxicos pode prejudicar a saúde das abelhas facilitando a infecção por patógenos, como *Nosema ceranae*, e potencialmente comprometer a colônia. Objetivou-se avaliar os impactos na sobrevivência e no epitélio do intestino médio de abelhas expostas a uma combinação de dois agrotóxicos na fase larval e ao patógeno *Nosema ceranae* na fase adulta. Larvas de primeiro instar de três colônias saudáveis de *Apis mellifera* foram transferidas para condições *in vitro* e alimentadas do terceiro ao sexto dia de alimentação com dieta artificial contendo 2% da solução teste: água – controle, acetona – controle solvente, inseticida clotianidina (0,17 ng/larva), fungicida piraclostrobina (0,69 ng/larva) ou inseticida + piraclostrobina. As abelhas recém-emergidas com um dia de idade, subsequentes a exposição larval, foram então inoculadas oralmente com 2µL de solução açucarada contendo 100.000 esporos de *Nosema ceranae*. A exposição ao inseticida e a combinação aos agrotóxicos afetaram a sobrevivência das abelhas apenas na fase adulta. Dentre os grupos experimentais, as abelhas expostas ao inseticida isolado e não infectadas pelo patógeno tiveram evidências de citotoxicidade nas células do intestino médio. A exposição aos dois agrotóxicos tornou os adultos subsequentes mais susceptíveis às ações do patógeno no intestino médio. Esse é o primeiro trabalho a avaliar os efeitos de combinações de agrotóxicos e do patógeno *Nosema ceranae* em duas fases diferentes do desenvolvimento de *A. mellifera*.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Patógeno. Co-exposição. Clotianidina. Piraclostrobina.

### 2.1 INTRODUÇÃO

Resíduos de agrotóxicos são encontrados no pólen e néctar de plantas (CODLING *et al.*, 2018; TONG *et al.*, 2018), recursos estes coletados pelas abelhas e levados até a colônia. Dentre os resíduos frequentemente detectados em matrizes apícolas estão os inseticidas neonicotinóides, que apesar das evidências que este grupo químico de agrotóxico pode causar risco à saúde das abelhas (GOULSON, 2013; SÁNCHEZ-BAYO; BELZUNCES; BONMATIN, 2017; TAVARES *et al.*, 2019), eles ainda são rotineiramente utilizados em diversos países (SIMON-DELSO *et al.*, 2015). Além dos inseticidas, outra classe de agrotóxico presente no pólen e no *bee bread* (alimento larval) são os fungicidas de diferentes grupos

químicos (RAIMETS *et al.*, 2020). Desse modo, as abelhas adultas e as larvas são expostas por meio da alimentação desses recursos a uma combinação de agrotóxicos que podem, em determinadas concentrações, causar efeitos prejudiciais à saúde das abelhas (BÖHME *et al.*, 2017).

Os inseticidas neonicotinóides e os fungicidas da classe estrobilurina são persistentes, móveis no meio ambiente e possuem ação sistêmica na planta (DECOURTYE; DEVILLERS, 2010; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2016).

Estudos com concentrações realística de inseticidas neonicotinóides mostraram que estes causam efeitos deletérios em abelhas adultas de *Apis mellifera*, como mudanças comportamentais (ALKASSAB; KIRCHNER, 2018; WILLIAMSON; WILLIS; WRIGHT, 2014), danos nas glândulas hipofaríngeas das operárias nutridoras (WESSLER *et al.*, 2016) e aumento da susceptibilidade de abelhas às infecções por patógenos (PRISCO *et al.*, 2013), bem como redução da longevidade em abelhas adultas expostas na fase larval (TADEI *et al.*, 2019).

Estudos do efeito de fungicidas em abelhas ainda são escassos; contudo, alguns deles mostraram que baixas doses de fungicidas podem estar relacionados com distúrbios na colônia (DEGRANDI-HOFFMAN *et al.*, 2015; SIMON-DELISO *et al.*, 2014), redução da longevidade das operárias (DOMINGUES *et al.*, 2017), alterações morfológicas em células digestivas do intestino médio com indução da apoptose (CARNEIRO *et al.*, 2020) e alterações comportamentais em abelhas adultas expostas na fase larval (TADEI *et al.*, 2019).

Contudo, as abelhas são expostas conjuntamente a outros fatores estressores, como a limitação e redução da diversidade de recursos florais e aos patógenos. Dentre os patógenos comuns em *A. mellifera*, está o fungo endoparasita *Nosema ceranae*. Isoladamente, esse patógeno altera níveis de expressão de proteínas nas abelhas adultas levando a alterações comportamentais como o forrageio precoce. Em combinação com o inseticida neonicotinóide imidacloprido, os efeitos do patógeno foram intensificados em abelhas operárias (ALAUX *et al.*, 2010) e rainhas (DUSSAUBAT *et al.*, 2016). Doublet *et al.* (2015) e Retschnig *et al.* (2015) também constataram a presença de sinergismo entre os dois estressores, aumentando a mortalidade *in vitro* de abelhas e prejudicando a imunocompetência das mesmas (GRASSL *et al.*, 2018).

As pesquisas das interações entre esses dois estressores representam menos de 1% dos estudos envolvendo agrotóxicos em abelhas adultas<sup>2</sup>. Os resultados publicados até o momento ainda são inconclusivos e, em alguns pontos, estudos *in vitro* e em colônias geraram dados que

---

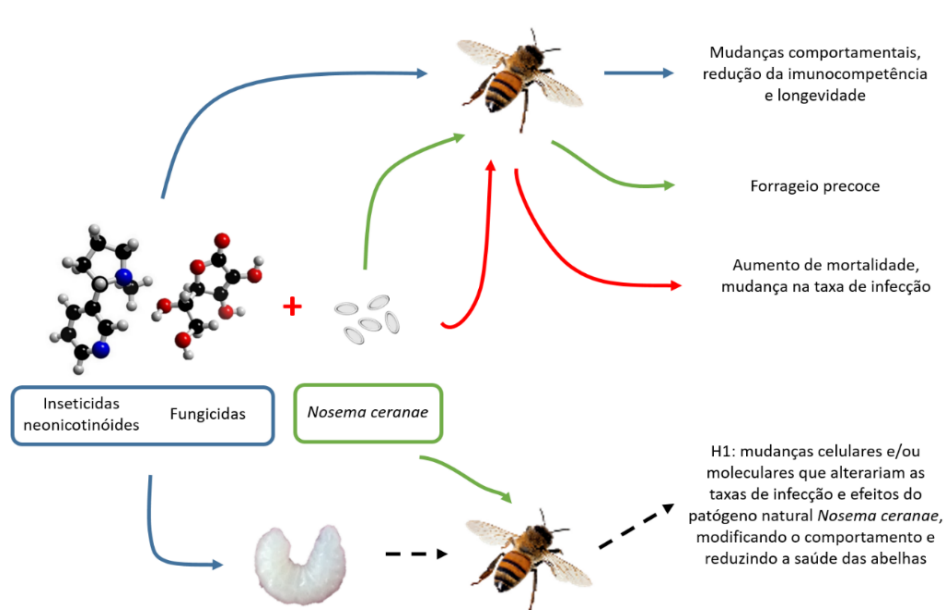
<sup>2</sup> Conforme busca na base “Periódicos CAPES” entre os anos de 1800 a 2019 utilizando as palavras chaves: *honey bee, Apis mellifera, larvae, neonicotinoid, fungicida, combination pesticides, Nosema ceranae.*

se contradizem (ODEMER *et al.*, 2018). Na natureza, as abelhas são expostas simultaneamente a diversos estressores (GOULSON *et al.*, 2015), portanto o estudo dessas interações se faz necessário.

Visto que a exposição aos neonicotinóides durante a fase adulta reduzem as defesas imunológicas das operárias (BRANDT *et al.*, 2016; PRISCO *et al.*, 2013) e que resíduos de fungicidas aumentam a probabilidade de distúrbios em colônias de abelhas (SIMON-DELISO *et al.*, 2014), e também aumentam a probabilidade de infecção por *Nosema* em abelhas adultas (PETTIS *et al.*, 2013), a hipótese deste trabalho (H1), evidenciada na Figura 5, é que a exposição à combinação desses dois agrotóxicos na fase larval acarreta em alterações celulares que alteram as taxas de infecção e os efeitos do patógeno natural *N. ceranae* durante a fase adulta, podendo modificar o comportamento e/ou longevidade e reduzir a saúde das abelhas. O presente estudo é inédito em nível mundial e fornecerá dados importantes para a compreensão do efeito dos diferentes fatores estressores (agrotóxicos e patógeno) em momentos distintos do ciclo de vida da abelha *A. mellifera*.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos causados pela exposição larval combinada do neonicotinóide e fungicida, e a influência na taxa de infecção por *Nosema ceranae* no intestino médio na fase adulta e suas possíveis alterações celulares.

FIGURA 5. Síntese dos efeitos dos agrotóxicos (neonicotinóides e fungicidas) e do patógeno *Nosema ceranae* em abelhas operárias adultas e hipótese dos efeitos da exposição combinada por esses estressores em diferentes fases do desenvolvimento da abelha.



Fonte: Elaborado pela autora com base em BORTOLOTTI *et al.*, 2003; GAGE *et al.*, 2018; PETTIS *et al.*, 2013; TADEI *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2019.



## 2.2 METODOLOGIA

### 2.2.1 Bioensaio larval em condições *in vitro*

A metodologia do bioensaio larval de exposição repetida aos agrotóxicos seguiu o protocolo nº 239 da OECD (OECD, 2016). Favos contendo larvas de primeiro instar, obtidas após postura monitorada da rainha, foram coletados do Apiário Bico Doce situado em Sorocaba – SP (Latitude 23° 35' 20", Sul; Longitude 47° 29' 59", Oeste).

Larvas de primeiro instar de três colônias saudáveis foram transferidas para cúpulas contendo 20 µL de alimento artificial – dieta A (composto por 50% de solução açucarada e 50% geleia real) (Tabela 1). As cúpulas foram dispostas em placas de cultura celular de 48 poços, as quais foram previamente forradas com algodão dental embebido em 500 µL de solução aquosa contendo 15% de glicerol e 0,2% de cloreto de metilbenzetonio. Em seguida, as placas foram acondicionadas em uma caixa hermética dentro da estufa B.O.D a 34±2°C, com ausência de luz, e umidade relativa de 95 ± 5% durante o desenvolvimento larval (Figura 6).

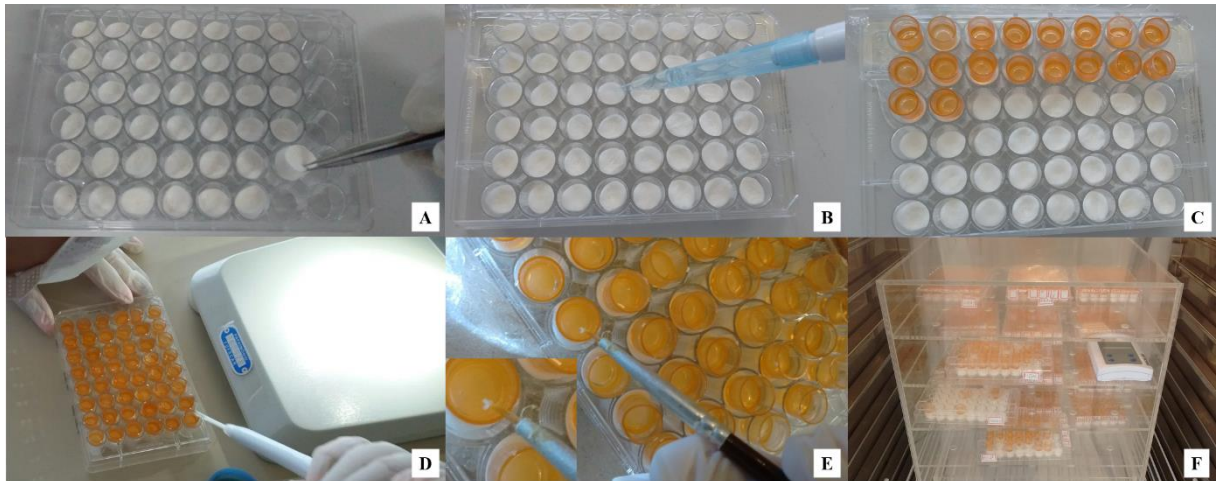
TABELA 1. Composição e volume das dietas oferecidas na fase de alimentação durante o desenvolvimento larval de *Apis mellifera*.

Dieta	Dia e volume ofertado	D-frutose (%)	D-glucose (%)	Extrato de levedura (%)	Geleia real (m/m)
A	1 (20µL)	12	12	2	50%
B	3 (20µL)	15	15	3	50%
C	4 (30µL), 5 (40µL) e 6 (50µL)	18	18	4	50%

Fonte: OECD nº 239, 2016.

Não houve manipulação das placas após 48 horas da transferência para a aclimação dos indivíduos, de acordo com o protocolo. No terceiro dia, os indivíduos mortos foram removidos e as placas foram organizadas em blocos conforme o delineamento experimental (Figura 7) para a exposição repetida de agrotóxicos.

FIGURA 6. Montagem de cúpulas para transferência das larvas de primeiro instar e acompanhamento do desenvolvimento pós-embriônico. A) Colocação de algodões estéreis em cada poço da placa de cultura. B) Adição de 500 $\mu$ L de solução aquosa contendo 15% de glicerol e 0,2% de cloreto de metilbenzetonio. C) Inserção das cúpulas estéreis sobre os algodões umedecidos. D) Adição da dieta artificial em cada cúpula, no primeiro dia do bioensaio. E) Transferência de larvas de 1<sup>o</sup> instar do favo para cada cúpula. F) Acondicionamento das placas contendo as larvas na caixa hermética mantida a 34 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, umidade relativa de 95  $\pm$  5% em estufa B.O.D.



Fonte: Autoria própria.

Do terceiro ao sexto dia do bioensaio, as larvas foram alimentadas individualmente com dieta artificial contendo 2% de solução teste, conforme o grupo experimental correspondente. O volume total de dieta consumido foi de 140  $\mu$ L/larva. A mortalidade larval foi observada diariamente. A umidade foi reajustada para 80%  $\pm$  5% no D7 e os algodões umedecidos foram removidos. No 15<sup>o</sup> dia, as cúpulas com pupas viáveis foram transferidas para potes específicos para a emergência dos adultos (potes de plástico transparentes e ventilados), contendo um alimentador lateral com solução aquosa de sacarose 50% m/v.

Após a emergência, as abelhas foram infectadas com esporos de *N. ceranae*, de acordo com o método descrito no tópico 2.2.3, e foi adicionado aos potes um comedouro com dieta líquida proteica contendo 17% de extrato de levedura, 2% de uma mistura de aminoácidos específica para animais (AMINOMIX®) e 81% de solução aquosa de sacarose 50% m/m, totalizando um teor proteico de 12% no alimento. A dieta proteica foi testada e adaptada de Morais *et al.* (2013), sendo utilizada a composição que resultou em maior consumo pela abelhas. As composições das dietas proteicas testadas estão sintetizadas no Apêndice 1 (Tabela 2).

## 2.2.2 Exposição larval aos agrotóxicos

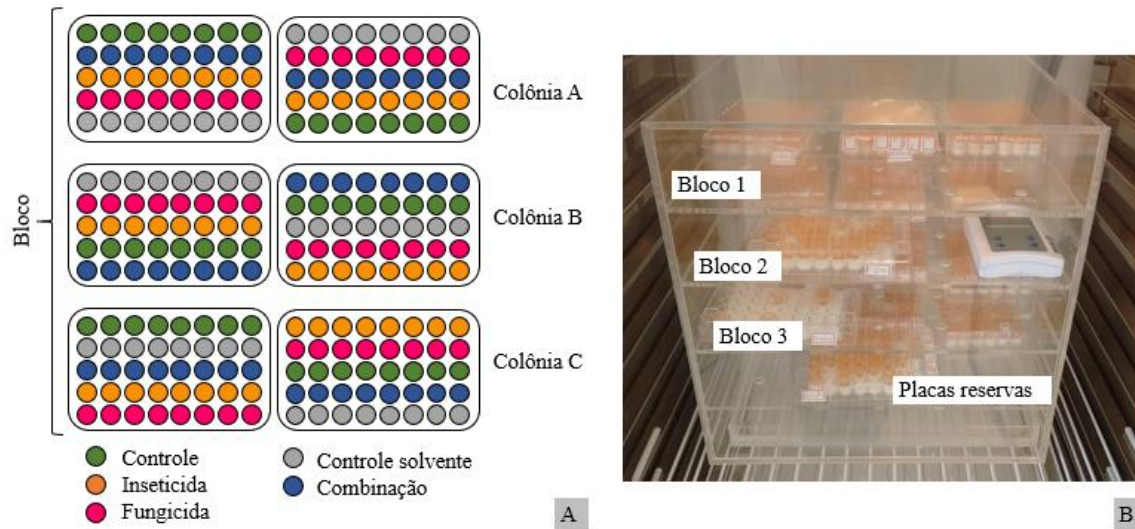
Para o teste de toxicidade larval foram utilizados os princípios ativos da clotianidina (CAS nº 210880-92-5, pureza  $\geq 98\%$ ), piraclostrobina (CAS nº 175013-18-0, pureza  $\geq 98\%$ ) e do dimetoato (CAS nº 1219794-81-6, pureza  $\geq 98\%$ ), adquiridos da Sigma-Aldrich<sup>TM</sup> St. Louis, Missouri, EUA.

As concentrações de agrotóxicos presentes na dieta larval foram baseadas em concentrações realísticas encontradas por outros estudos no “*bee bread*” e pólen de abelhas, ou seja, 41,6 ppb para o inseticida neonicotinóide clotianidina (MOGREN; LUNDGREN, 2016) e 146 ppb para o fungicida estrobilurina piraclostrobina (MULLIN *et al.*, 2010; TOSI *et al.*, 2018). Com base nesses valores, a concentração desses princípios ativos na dieta foram calculadas conforme o consumo total (*intake*) de pólen de uma abelha na fase larval (5,4 mg em cinco dias de alimentação, de acordo com Babendreier *et al.*, 2004). A concentração de clotianidina e piraclostrobina (princípio ativo e formulação comercial) na dieta foi de 1,4 ppb (*intake* = 0,17 ng/larva) e de 4,93 ppb (*intake* = 0,69 ng/larva), respectivamente.

Para preparação das soluções dos agrotóxicos, os princípios ativos foram diluídos em solução aquosa com 4% de acetona. A concentração de acetona utilizada não ultrapassou 0,01% do volume final da dieta.

Os grupos experimentais foram distribuídos igualmente entre as placas de cultura (Figura 7), sendo eles: I – controle (CTL), II – controle solvente (acetona - ACT), III – inseticida clotianidina (INS), IV – fungicida piraclostrobina (FUNG), V – Combinação: inseticida + fungicida (COMB). Cada bioensaio foi composto por um total de 18 placas (N = 144 larvas/grupo experimental). Concomitantemente foi realizado o teste toxicológico com o dimetoato (inseticida padrão, *intake* = 7420 ng/larva) para validação do teste segundo a OECD nº 239 (OECD, 2016). O bioensaio foi repetido quatro vezes para obtenção do N amostral.

FIGURA 7. Delineamento experimental do bioensaio de exposição larval aos agrotóxicos. Cada bloco continha duas placas de cada colônia (A), totalizando três blocos experimentais que foram distribuídos nas prateleiras da caixa hermética. A última prateleira continha três placas reservas para substituição de indivíduos mortos antes do primeiro dia da exposição (B).



Fonte: Autoria própria.

### 2.2.3 Infecção de abelhas recém-emergidas por *Nosema ceranae*

Esporos de *Nosema ceranae* foram obtidos de abelhas forrageiras de *Apis mellifera* africanizada infectadas, obtidas de colônias localizadas em apiário comercial (Latitude 23° 35' 20", Sul; Longitude 47° 29' 59", Oeste, Sorocaba - SP), sendo a espécie do microsporídio confirmada por diagnóstico molecular (GREGORC *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2015). Os esporos foram extraídos por meio da maceração do abdômen de acordo com o método de Fries *et al.* (2013) adaptado por Eiri *et al.* (2015) e misturados em solução açucarada para alimentação *ad libitum*, por dois dias consecutivos, das operárias jovens de *A. mellifera* previamente aclimatadas em potes de plástico transparentes em condições *in vitro*, para garantir um estoque de esporos frescos para a infecção das recém-emergidas resultantes do bioensaio larval.

Após dez dias da alimentação das abelhas jovens com os esporos, estas foram anestesiadas em temperatura baixa para maceração do abdômen e extração dos esporos. A solução de esporos resultante foi centrifugada e o precipitado foi ressuspensionado em solução açucarada até a obtenção da concentração final de 50.000 esporos/ $\mu$ L, mensurada com um hemocitômetro. Esta solução final de esporos frescos foi armazenada em um refrigerador e utilizadas em menos de 24 horas, conforme recomendado por Fries *et al.* (2013).

Após um dia da emergência das abelhas resultantes do bioensaio larval, metade dos indivíduos pertencentes ao mesmo grupo experimental e colônia foram inoculadas individualmente, por via oral, com 2  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de sacarose 50% m/v contendo 50.000 esporos/ $\mu\text{L}$  (KURZE *et al.*, 2018) e a outra metade recebeu 2  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de sacarose 50% m/v sem esporos. Os indivíduos que não ingeriram totalmente a solução oferecida foram desconsiderados. Cada novo grupo experimental (Tabela 3) foi acondicionado em potes separados e devidamente identificados.

TABELA 3. Grupos experimentais após a emergência das abelhas adultas, dose de agrotóxicos e número de esporos ingeridos. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS).

<b>Grupo experimental</b>	<b>Clotianidina (ng/larva)</b>	<b>Piraclostrobina (ng/larva)</b>	<b>Esporos/abelha</b>
CTL	0	0	0
CTL + esporo	0	0	100.000
ACT	0	0	0
ACT + esporo	0	0	100.000
INS	0,17	0	0
INS + esporo	0,17	0	100.000
FUNG	0	0,69	0
FUNG + esporo	0	0,69	100.000
COMB	0,17	0,69	0
COMB + esporo	0,17	0,69	100.000

Diariamente, foram removidas as abelhas mortas para registro da mortalidade e para determinação do nível de infecção por meio da contagem de esporos de *N. ceranae*. O abdômen de cada abelha foi macerado individualmente em um mililitro de água destilada. A solução resultante foi filtrada e preencheu-se a câmara de Neubauer com aproximadamente 200  $\mu\text{L}$  da solução de esporos e, em microscópio óptico, foi contabilizada o número de esporos presentes em cinco quadrantes da câmara (Figura 8). Esporos sobre as linhas inferiores e linha esquerda desses quadrantes foram considerados na contagem. O número total de esporos foi calculado conforme o volume correspondente da câmara de Neubauer (equação 1 a 3). No total, 200 abelhas mortas foram analisadas individualmente para contagem dos esporos.

$$\text{Esporos/abelha} = \frac{M \times V1}{V2} \quad (1)$$

Sendo, M = média de esporos

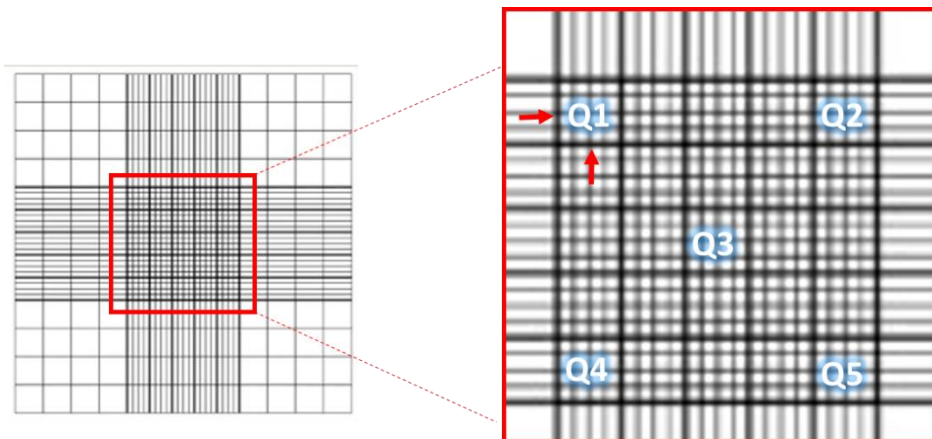
V1 = volume utilizado por abelha em mm<sup>3</sup>

V2 = volume de um quadrante em mm<sup>3</sup>

$$\text{Esporos/abelha} = \frac{M \times 10^3}{0,004} \quad (2)$$

$$\text{Esporos/abelha} = \frac{Q1+Q2+Q3+Q4+Q5}{5} \times \frac{10^6}{4} \quad (3)$$

FIGURA 8. Padrão de contagem de esporos em câmara de Neubauer. Q1 ao Q5 = quadrantes considerados para contagem; seta= indica linhas de cada quadrante que foram consideradas na contagem caso o esporo esteja sobre elas. Área central = 0,05mm x 0,05 mm = 0,0025 mm<sup>2</sup> x 16; Profundidade = 0,1 mm; Volume = 0,004 mm<sup>3</sup>; Volume total = 25 x 0,004 mm<sup>3</sup> = 0,1 mm<sup>3</sup> = 0,0001 cm<sup>3</sup>.



Fonte: Adaptado de SILVESTRE, A. M.; LAVIN, S.; CUENCA, R. Hematologia y citologia sanguínea em reptiles. *Clin. Vet. Peq. Anim*, v. 31, n. 3, p. 131-141, 2011.

#### 2.2.4 Análise histológica

Para identificar os efeitos da co-exposição larval aos agrotóxicos e da infecção por *Nosema* no intestino médio, abelhas operárias adultas emergidas dos bioensaios larvais (Tabela 3) foram coletadas dos potes aos seis dias após a inoculação, anestesiadas por refrigeração e

submetidas à dissecação. Os intestinos coletados foram imersos em solução fixadora (paraformaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1 M; pH 7,4) por 24 horas a 4°C.

Os órgãos fixados foram lavados no mesmo tampão fixador e submetidos a uma desidratação lenta gradativa com trocas em soluções de etanol com concentração crescente (15, 30, 50, 70 – “overnight”, 85, 90, 95 e 100%) à baixa temperatura (4°C) por uma hora a cada concentração e duas trocas no álcool 100%, de acordo com a metodologia descrita por Silva-Zacarin *et al.* (2012). Três órgãos por grupo experimental foram embebidos em historesina líquida Leica® por cinco dias (10°C) e, em seguida, emblocados em histomoldes em historesina de inclusão (historesina de embebição acrescida de catalisador na proporção 15mL:1mL). Após a polimerização, os blocos de resina foram submetidos a microtomia para obter secções histológicas dos órgãos com 3 µm de espessura. Por indivíduo foram produzidas seis lâminas com 12 secções cada.

As análises histológicas foram realizadas por meio da caracterização semi-quantitativa de alterações do intestino médio a partir da observação de seis secções por indivíduo, totalizando três indivíduos por grupo experimental. Para isso, as lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina (1%) (ANEXO 1) para análise morfológica do intestino e Azul de toluidina (1%, pH ≈10, ANEXO 2) para detecção de células infectadas com esporos de *Nosema* (FRIES *et al.*, 2013). Em seguida, o escore foi calculado conforme o nível de intensidade de cada característica histopatológica observada.

Os parâmetros utilizados para avaliar as alterações no intestino médio das abelhas, Tabela 4, foram estabelecidos com base nos estudos de Bernet *et al.* (1999), Grella *et al.* (2019) e Oliveira *et al.* (2019). Para cada parâmetro foi atribuído um valor de acordo com a importância da alteração e o valor de escore. As alterações foram classificadas em quatro níveis de intensidade: 0 – ausência de alteração, 1 – alteração sutil, 2 – alteração moderada, 3 – alteração intensa. O fator de importância foi classificado em três níveis: 1 – mínima importância patológica (danos reversíveis), 2 – moderada importância patológica (danos geralmente reversíveis); 3 – severa importância patológica (danos irreversíveis) (BERNET *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O índice de lesão ( $I_{le}$ ) para cada alteração foi calculado a partir do nível de intensidade e o fator de importância (Equação 4). Para cada secção analisada também foi calculado o Índice de lesão do órgão ( $I_{org}$ ) conforme definido por Bernet *et al.* (1999) e adaptado por Oliveira *et al.* (2019), a partir da somatória dos índices de lesão (Equação 5).

$$I_{le} = a \times w \quad (4)$$

$$I_{org} = \sum_{alt} a \times w \quad (5)$$

Sendo, a = nível de intensidade

w = fator de importância

$\sum_{alt}$  = somatória de alterações

TABELA 4. Parâmetros histológicos qualitativos utilizados para análise semi-quantitativa para determinação de danos no intestino médio de abelhas exposta a estressores e o fator de importância correspondente. \*Dados quantitativos (frequência) foram utilizados para definição do escore.

<b>Parâmetros</b>	<b>Fator de importância</b>
Redução da espessura do epitélio *	1
Pequenos vacúolos no citoplasma	1
Secreção apócrina	1
Liberação de células para o lúmen	1
Diferenciação dos ninhos de células regenerativas	1
Núcleos com cromatina compactada	1
Desestruturação epitelial	2
Núcleo picnótico nas células digestivas	2
Vacuolização degenerativa / perda citoplasmática	2
Matriz peritrófica modificada	2
Infecção de células com esporos de <i>Nosema</i> *	2
Vilosidades (estrutura, distribuição e frequência)	3
Redução de ninhos de células regenerativas	3
Núcleo picnótico nas células regenerativas	3

A espessura do epitélio foi medida por meio do software Image Pro-Plus 6.0, desconsiderando a matriz peritrófica. Considerou-se o eixo maior da célula para as medições, ou seja, partindo da lâmina basal e se estendendo até a porção apical das células digestivas, incluindo a bordadura em escova (FERNANDES *et al.*, 2010) (Tabela 5). Para o cálculo do escore referente a redução da espessura do epitélio, os níveis de intensidade 0, 1, 2 e 3 foram atribuídos respectivamente aos seguintes intervalos: >50  $\mu\text{m}$ , 41-50  $\mu\text{m}$ , 35-40  $\mu\text{m}$ , <35  $\mu\text{m}$ .



A taxa de infecção no intestino médio foi medida pela relação entre o número de células totais e o número de células infectadas. Para isso, separou-se o intestino médio em três regiões, as quais foram classificadas como anterior (próxima à válvula cardíaca), central e região posterior (próximo ao local de inserção dos túbulos de Malpighi no início do intestino posterior). Em cada uma dessas regiões do intestino médio foram analisados quatro diferentes campos (Tabela 5). O número total de células foi contado a partir do número de núcleos das células epiteliais (excluindo-se as células indiferenciadas do ninho de células regenerativas) e a taxa de infecção pelo número de células infectadas com esporos maduros e com esporos imaturos, utilizando o software ImageJ - Fiji. Os níveis de intensidades do escore foram atribuídos conforme a porcentagem de células infectadas: 0 – 0% de infecção, 1 – menor que 30% de infecção, 2 – entre 30 e 65% de infecção e, 3 – maior que 65% de infecção.

TABELA 5. Parâmetros utilizados para morfometria do intestino e quantificação da taxa de células infectadas pelo esporo de *Nosema ceranae*.

	Células infectadas	Espessura epitélio por região do intestino
Nº de indivíduos	3	3
Aumento final	400x	100x
Nº de secções por lâmina	5	5
Campos de visão por secção histológica	12	12
Coloração	Azul de toluidina	H.E.

A detecção de proteínas totais foi realizada por meio da reação com Azul de Bromofenol (adaptado de PEARSE, 1960, ANEXO 3), para a detecção de glicoconjugados neutros e glicogênio utilizou-se a reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS) (MCMANUS, 1946, ANEXO 4) e para detecção de lipídios foi realizada a coloração com Sudam Black B (SILVA-ZACARIN *et al.*, 2012, ANEXO 5). Para isso, analisou-se 12 secções de um indivíduo para averiguar a presença ou ausência de reação positiva tanto na secreção como na região de vacuolização observadas nas células do epitélio intestinal.

### 2.2.5 Identificação de morte celular

Intestinos médio fixados de abelhas, após a desidratação lenta com serie crescente de álcool, foram diafanizados com xilol e incluídos em parafina histológica a 60°C por três horas. Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia e lâminas silanizadas foram montadas contendo 12 secções histológicas com 8 µm cada, sendo esta espessura a ideal para análise por microscopia confocal de varredura a laser. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas com xilol e reidratadas em cascata decrescente de álcool.

As secções histológicas foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 0,1M (pH 6) por 1 minuto e 30 segundos no micro-ondas em potência alta. Após a recuperação antigênica e permeabilização com citrato, as lâminas foram lavadas em tampão PBS e mantidas em câmara úmida para reação de TUNEL (“Terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling”), segundo método de Gavrieli, Sherman e Bensasson (1992), a fim de identificar regiões de quebras de DNA de fita simples e dupla, indicativas de início de morte celular. Para isso, o Kit de Detecção de Morte de Células In Situ (ISCDDK – “In-Situ Cell Death Detection Kit”, Roche®) foi aplicado nas secções histológicas do intestino médio de abelhas. Utilizou-se 50 µL da solução de reação de Tunel por lâmina, as quais foram incubadas na solução por uma hora a 37°C no escuro. Após a reação, as lâminas foram lavadas com tampão PBS e montadas com meio de montagem com DAPI (350/455 nm, faixa de excitação/emissão) para evidenciação dos núcleos das células. Os núcleos positivos a reação de TUNEL são identificados pela presença de nucleotídeos marcados com fluoresceína.

A análise foi realizada por meio de microscopia confocal de varredura a laser. Utilizou-se o laser com comprimento de onda de 488 nm, na intensidade cinco para detecção de núcleos positivos a reação de TUNEL. A faixa de leitura utilizada foi 480 a 576 nm, correspondente a excitação e emissão da fluoresceína (identificação dos núcleos com quebras no DNA), ganho de 1034,8 V e *offset* de -30%. Percorreu-se três secções histológicas por grupo experimental para análise da presença ou ausência de células com marcação positiva para fragmentação do DNA.

### 2.2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa R (versão 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, AT, 2019). Todos os dados foram analisados por modelos não-paramétricos, sendo previamente verificados pelo teste de normalidade de

Shapiro-wilk e pelo teste de homogeneidade de Bartlett. Utilizou-se modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição binomial e quasibinomial para análise dos dados de sobrevivência, e GLM de gaussian e quasipoisson para análises morfométricas. Dados de contagem de esporos e os índices de lesões foram analisados por meio do teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, com valor de P ajustado pelo método de Benjamini-Hochberg. O modelo estatístico utilizado para cada conjunto de dados foi estabelecido com base na análise de resíduos realizado pelo Half-normal plot usando o pacote hnp (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). Utilizou-se a regressão de Cox e o pacote “survival” (THERNEAU, 2015; THERNEAU; GRAMBSCH, 2000) para análises da sobrevivência e longevidade das abelhas adultas e para o tempo letal médio foi utilizado o pacote “ecotox” (HLINA *et al.*, 2018). Considerou-se significativos valores com  $P < 0,05$ .

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Exposição aos agrotóxicos

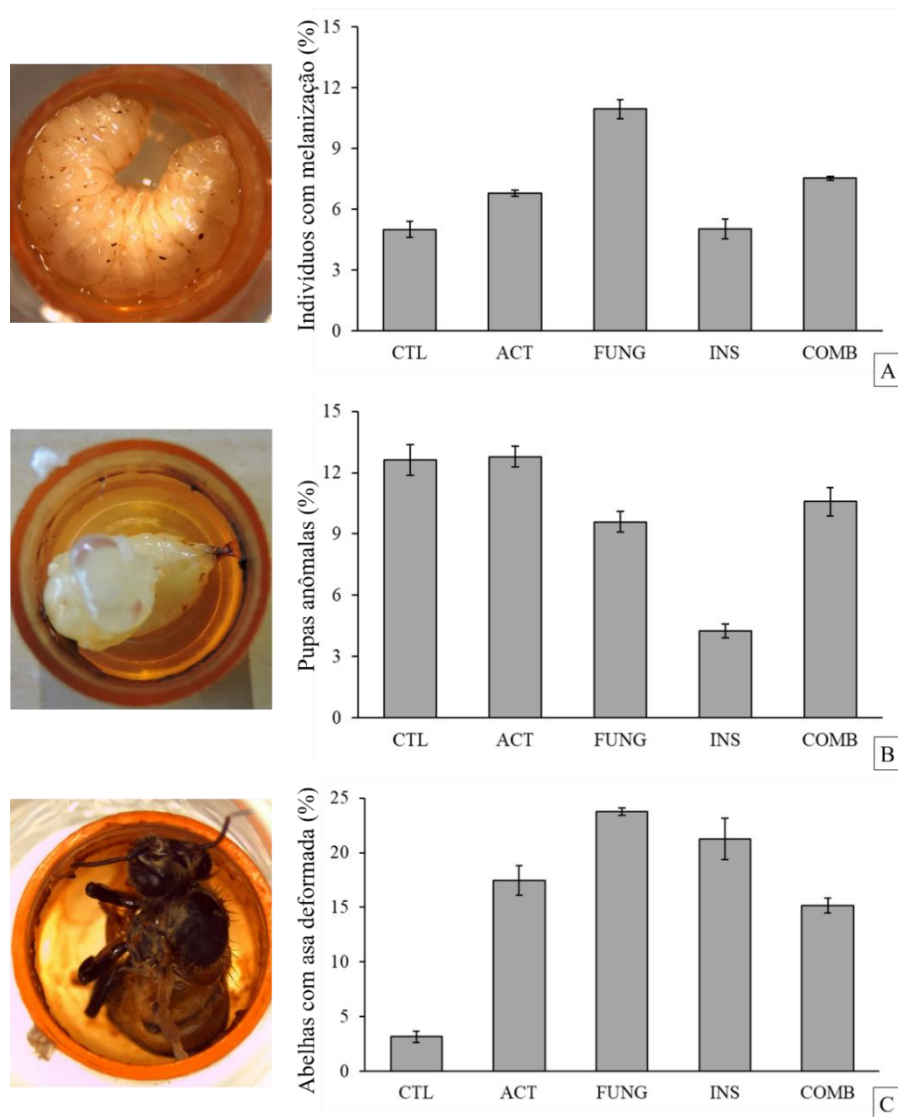
Após a exposição larval aos agrotóxicos, observou-se que os princípios ativos do inseticida e fungicida isolados e combinados não afetaram o desenvolvimento pós-embrionário das abelhas (Tabela 6). A taxa de pupação e de emergência não foram afetadas por nenhum dos grupos experimentais ( $P = 0,33$  e  $P = 0,95$ , respectivamente). O bioensaio foi validado pela alta mortalidade das larvas expostas ao dimetoato (controle positivo),  $P < 0,01$ .

TABELA 6. Taxas médias da mortalidade relativa e das fases de desenvolvimento durante o período pós-embrionário (média  $\pm$  erro padrão). Emergência (larva): taxa de emergência calculada a partir do número inicial de larvas; Emergência (pupa): taxa de emergência calculada a partir do número inicial de pupas de olho branco. <sup>1</sup>Não há diferença significativa entre os grupos experimentais, letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos, P significativo  $< 0,05$ .

	Mortalidade larval	Pupação <sup>1</sup>	Emergência <sup>1</sup> (larva)	Emergência <sup>1</sup> (pupa)
Controle	14,17 $\pm$ 2,59 a	73,26 $\pm$ 3,37	40,22 $\pm$ 1,53	58,21 $\pm$ 4,54
Acetona	13,82 $\pm$ 2,27 a	75,23 $\pm$ 3,17	38,15 $\pm$ 1,44	59,97 $\pm$ 4,45
Inseticida	20,41 $\pm$ 3,87 a	73,27 $\pm$ 4,27	41,53 $\pm$ 1,94	59,91 $\pm$ 3,97
Fungicida	18,67 $\pm$ 3,67 a	76,55 $\pm$ 3,42	49,58 $\pm$ 2,63	62,91 $\pm$ 4,55
Combinado	21,20 $\pm$ 4,42 a	69,55 $\pm$ 4,84	32,64 $\pm$ 2,02	58,75 $\pm$ 4,46
Dimetoato	91,67 $\pm$ 1,44 b	-	-	-

Durante o desenvolvimento das abelhas, foram observadas melanização nas larvas, pupas anômalas e adultos emergentes com asa deformada em todos os grupos experimentais. Apesar das taxas de anomalias serem maiores em alguns grupos (Figura 9), não houve diferença significativa na frequência dessas entre os grupos experimentais. Entretanto, a análise estatística mostrou que as diferenças observadas são provenientes das diferenças intercoloniais ( $P = 0,02$ ).

FIGURA 9. Taxa de anomalias observadas durante o desenvolvimento pós-embriônico (média  $\pm$  erro padrão). A) Melanização ( $P=0,06$ ): presença de pontuações pretas no corpo de larvas e/ou pupas; B) Pupa anômala ( $P=0,3$ ): coloração desigual dos olhos ou corpo sem os apêndices; C) Asa anômala ( $P=0,5$ ): abelha adulta com asa não desenvolvida ou com formato deformado. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS).



A exposição ao inseticida e a combinação dos agrotóxicos reduziu a taxa de sobrevivência das abelhas ao longo do tempo (Figura 10A,  $P < 0,01$ ) e o tempo letal médio

(Figura 11). Em combinação ao patógeno essa redução não foi observada (Figura 10B,  $P = 0,13$ ). As abelhas expostas ao fungicida e ao patógeno tiveram a longevidade maior em relação aos outros grupos inoculados ao patógeno.

FIGURA 10. Curva de sobrevivência e longevidade das abelhas adultas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval. A) Sem inoculação de esporos de *Nosema ceranae*; B) Com inoculação de *Nosema ceranae* nas abelhas adultas com 1 dia; C) Comparação entre os grupos experimentais, letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ). \* diferença significativa entre os grupos controles ( $P < 0,05$ ). CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS).

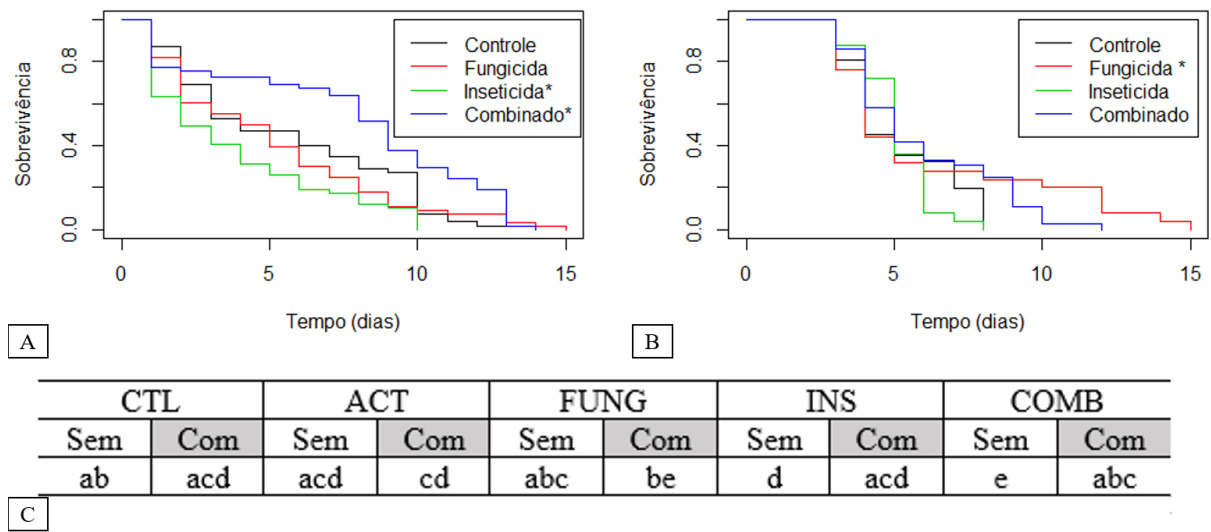
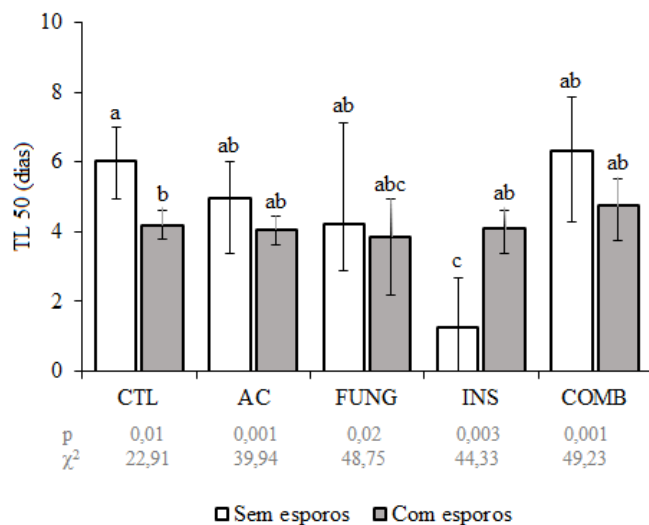


FIGURA 11. Tempo letal médio (TL 50) de *A. mellifera* africanizada expostas aos agrotóxicos durante a fase larval. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS). Letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ).



A inoculação com *Nosema ceranae* não interferiu na longevidade das abelhas, porém reduziu o tempo letal médio do grupo controle sem esporo (Figura 11). Essa redução, com exceção do inseticida, também foi observada nos outros grupos, porém não foi significativa.

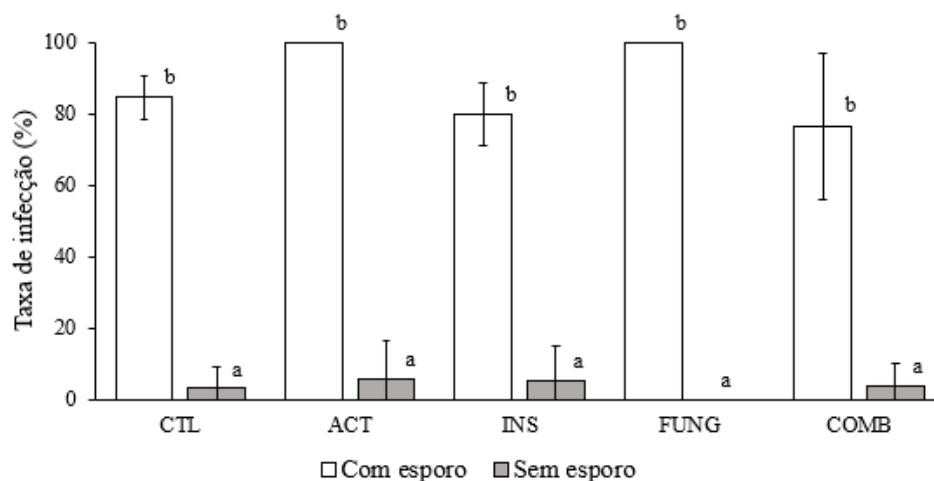
### 2.3.2 Infecção com esporos de *Nosema ceranae*

Como esperado, os grupos que não foram inoculados com esporos de *Nosema ceranae* não apresentaram esporos ou possuíram um número muito baixo (Tabela 7,  $P = 0,01$ ). O monitoramento da infecção pela contagem de esporos das abelhas mortas ao longo do bioensaio não resultou em diferença significativa na quantidade de esporos presente nos grupos experimentais que foram inoculados com o patógeno (Tabela 7,  $P = 0,87$ ), nem na taxa de infecção entre os grupos que foram inoculados (Figura 12,  $P = 0,99$ ). O número de esporos resultantes da contagem pela câmara de Newbauer não diferiu de acordo com a idade das abelhas mortas ( $P > 0,05$ ).

TABELA 7. Estimativa de número de esporos (média e mediana) presentes nas abelhas adultas mortas a partir da contagem em câmara de Newbauer. Letras representam diferença significativa entre os grupos,  $P$  significativo  $<0,05$ .

	Nº esporo inicial	Média	Mediana	Desvio padrão	
Controle	0	3.333,33	0	18.257,42	a
	100.000	125.000	100.000	110.128,92	b
Acetona	0	3.846,15	0	13.587,32	a
	100.000	136.538,46	100.000	117.947,19	b
Inseticida	0	1.724,14	0	9.284,77	a
	100.000	97.619,05	100.000	84.374,45	b
Fungicida	0	0	0	0	a
	100.000	125.000	100.000	90.960,48	b
Combinado	0	2.083,33	0	10.206,21	a
	100.000	86.666,67	75.000	79.798,60	b

FIGURA 12. Taxa de infecção a partir da análise das abelhas mortas resultantes do bioensaio de infecção (média  $\pm$  erro padrão). Considerou-se infectadas todas as abelhas que apresentaram um ou mais esporos na contagem pela câmara de Newbauer. (Letras representam diferença significativa entre os grupos, P significativo < 0,05). CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS).



Entretanto, a taxa de infecção celular, analisada por meio de secções histológicas do intestino médio, diferiu entre os tratamentos (Figura 13,  $P = 0,003$ ). A exposição ao inseticida e à co-exposição aos agrotóxicos, durante a fase larval, aumentou a taxa de células infectadas com *Nosema ceranae* (Figura 13A,  $P < 0,001$ ), cerca do dobro de células foi afetado pelo esporo em comparação aos grupos controles. Nas abelhas expostas ao inseticida, a infecção atingiu mais da metade das células do intestino médio aos seis dias após a inoculação. A exposição ao princípio ativo do fungicida aumentou a taxa de células infectadas com esporos maduros em três vezes mais ( $P < 0,001$ ), porém essa diferença não foi observada na infecção total ( $P = 0,28$ ).

Observou-se que a taxa de infecção foi diferente conforme a região do intestino médio (ventrículo) e a maioria das células digestivas possuíam esporos na forma imatura (Figura 14). A região anterior do ventrículo, nos grupos expostos, teve uma taxa de infecção menor (Figura 13B) que a região mediana e posterior do órgão ( $P < 0,0001$ ). Em média, a região posterior apresentou maior taxa de células com esporos maduros que as demais regiões ( $P=0,01$ ). Esporos imaturos foram observados em todo órgão, sendo menos pronunciados na região anterior ( $P<0,01$ ). A taxa de infecção e a proporção de esporos imaturos entre a região média e posterior não diferiu significativamente ( $P>0,6$ ), Figura 13C.

FIGURA 13. Padrão de infecção celular após seis dias da inoculação com esporos de *Nosema ceranae* no intestino médio de *Apis mellifera* africanizada (média  $\pm$  erro padrão). A) Taxa de infecção em diferentes estágios do desenvolvimento do patógeno por tratamento; B) Taxa de infecção por região do intestino médio; C) Taxa de infecção por região do órgão e estágio de desenvolvimento do patógeno. Letras da mesma cor representam diferenças significativas entre os grupos experimentais. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS), Esp - esporo.

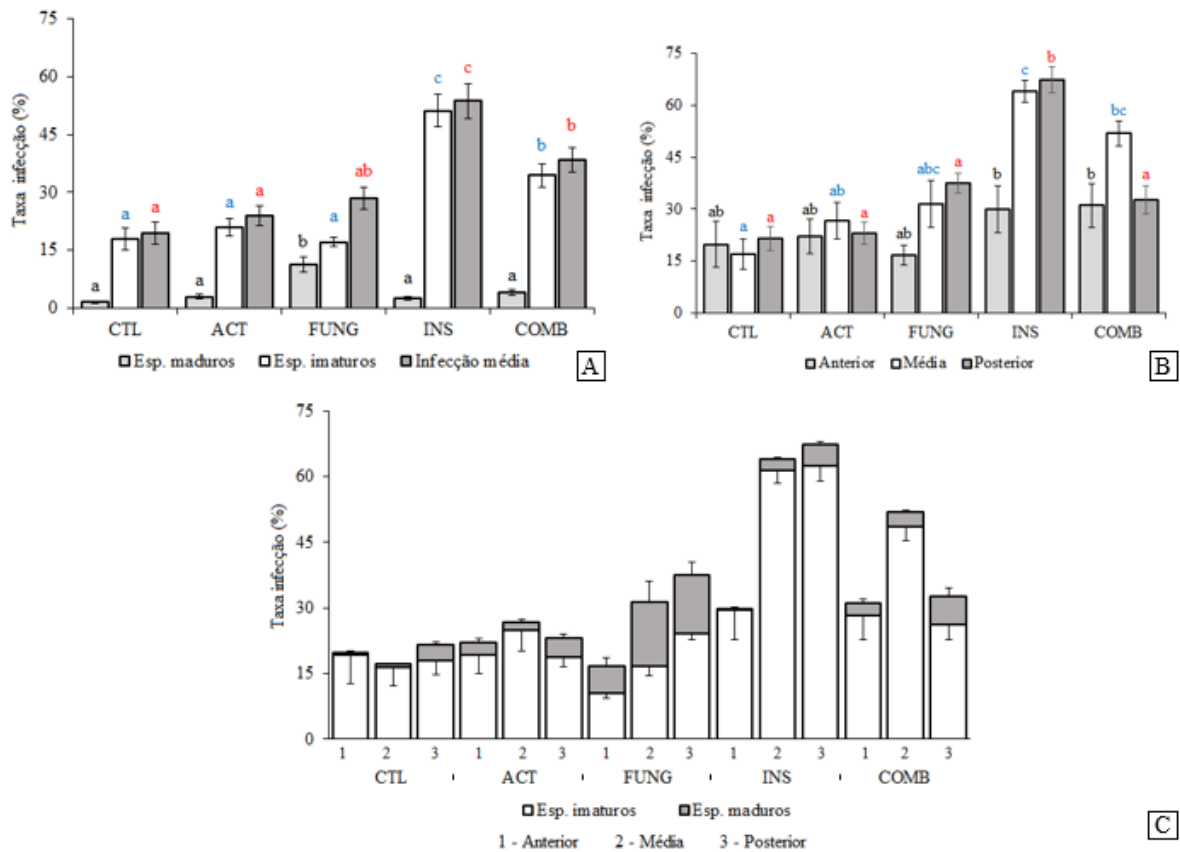
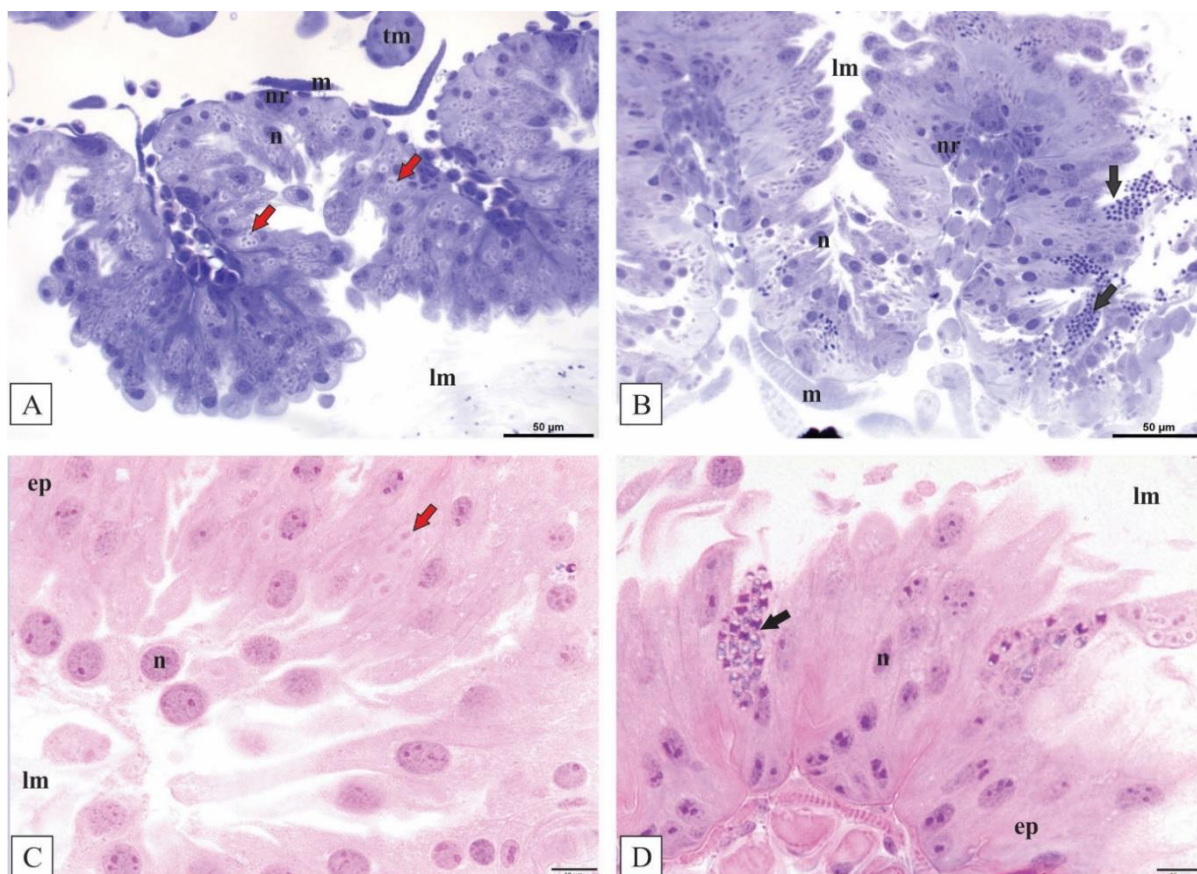




FIGURA 14. Fases de desenvolvimento do esporo de *N. ceranae* no epitélio ventricular de abelha. A) Epitélio infectado por esporos na fase imatura (seta vermelha), coloração azul de toluidina; B) Epitélio infectado por esporos na fase imatura e madura (seta preta), coloração azul de toluidina; C) Infecção por esporos imaturos no epitélio, H.E.; D) Infecção por esporos maduros no epitélio sendo liberados para o lúmen, H.E. tm – Túbulo de Malpighi, nr – ninho de células regenerativas, lm – lúmen, n - núcleo.



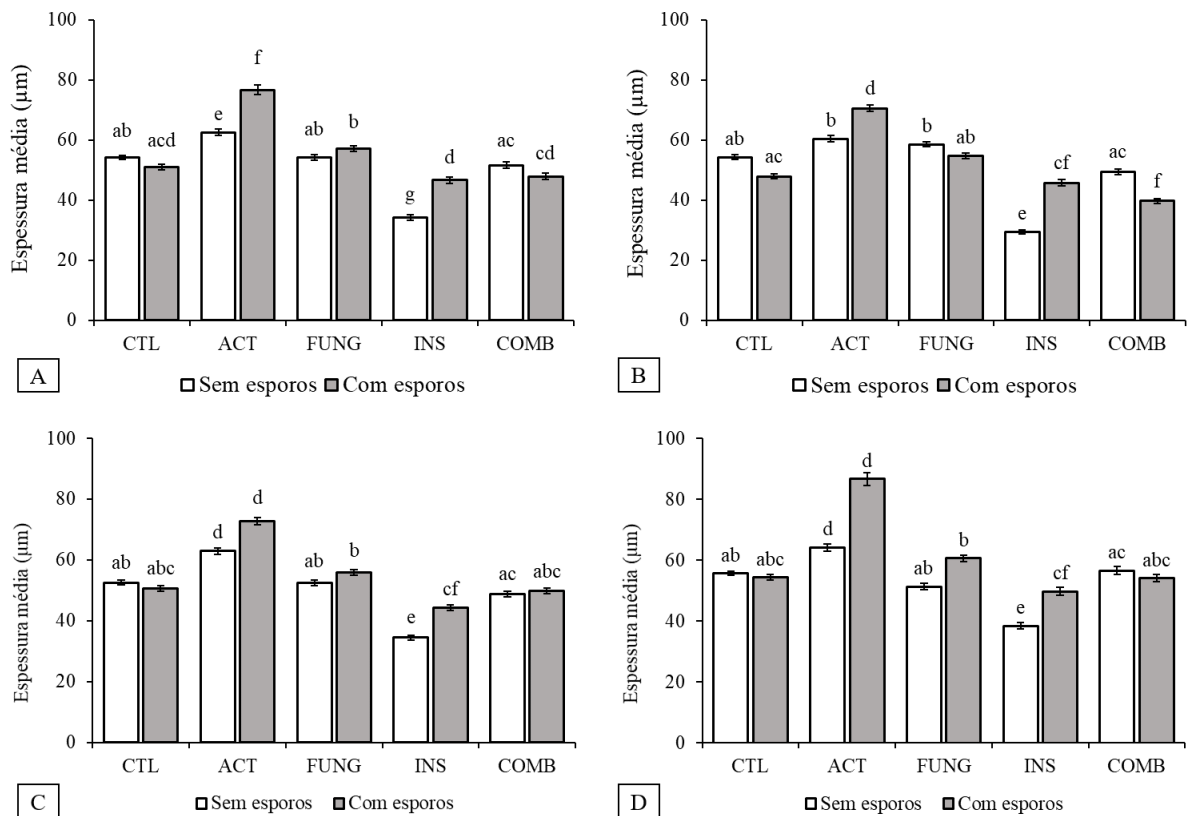
### 2.3.3 Espessura do epitélio ventricular

Por meio da morfometria do epitélio observou-se que a região posterior do ventrículo possui uma espessura média maior que as demais regiões ( $P = 0,001$ ). A inoculação com esporos de *Nosema ceranae* em abelhas não expostas aos agrotóxicos não alterou a espessura do epitélio (Figura 15). O grupo ACT + esporo apresentou uma altura do epitélio maior que os demais grupos ( $P < 0,001$ ).

As abelhas expostas ao inseticida (com e sem esporos) apresentaram um epitélio mais fino ( $P < 0,001$ ). A redução da espessura do epitélio foi mais pronunciada quando as abelhas foram expostas apenas ao inseticida na fase larval. O fungicida não afetou a espessura do epitélio dos adultos emergentes ( $P = 0,99$ ). As abelhas co-expostas aos agrotóxicos não sofreram alteração da espessura do epitélio do intestino ( $P = 0,08$ ), entretanto na região anterior

do órgão as abelhas expostas também ao patógeno apresentaram redução na espessura (Figura 15B,  $P = 0,003$ ), nas outras áreas do intestino médio essa redução não foi significativa (Figura 15C e D).

FIGURA 15. Espessura do epitélio ventricular de *Apis mellifera* (média  $\pm$  erro padrão). A) Média da espessura do órgão; B) Espessura média da região anterior do ventrículo; C) Espessura média da região central do ventrículo; D) Espessura média da região posterior do ventrículo. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS). Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.



### 2.3.4 Análise histológica e histoquímica

A frequência de alterações morfológicas no intestino médio com fator de importância 1, ou seja, mínima importância patológica, diferiu entre os grupos experimentais (Figura 16 e 17). A presença de secreção apócrina e de pequenos vacúolos no citoplasma foi elevada nos grupos controles (Figura 16A e C), enquanto núcleos com cromatina compactada só foram observados em indivíduos que foram expostos a algum dos agrotóxicos.

A exposição aos agrotóxicos e a inoculação com esporos de *Nosema* aumentou a taxa de liberação de células para o lúmen (Figura 16D), com exceção do grupo INS. Esse aumento também foi observado no grupo ACT + esporos.

FIGURA 16. Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de baixa importância patológica (média  $\pm$  erro padrão). A) Secreção apócrina; B) Núcleo com cromatina compactada; C) Pequenos vacúolos no citoplasma; D) Liberação de células no lúmen; E) Altura do epitélio; F) Diferenciação do ninho de células regenerativas. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS). Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

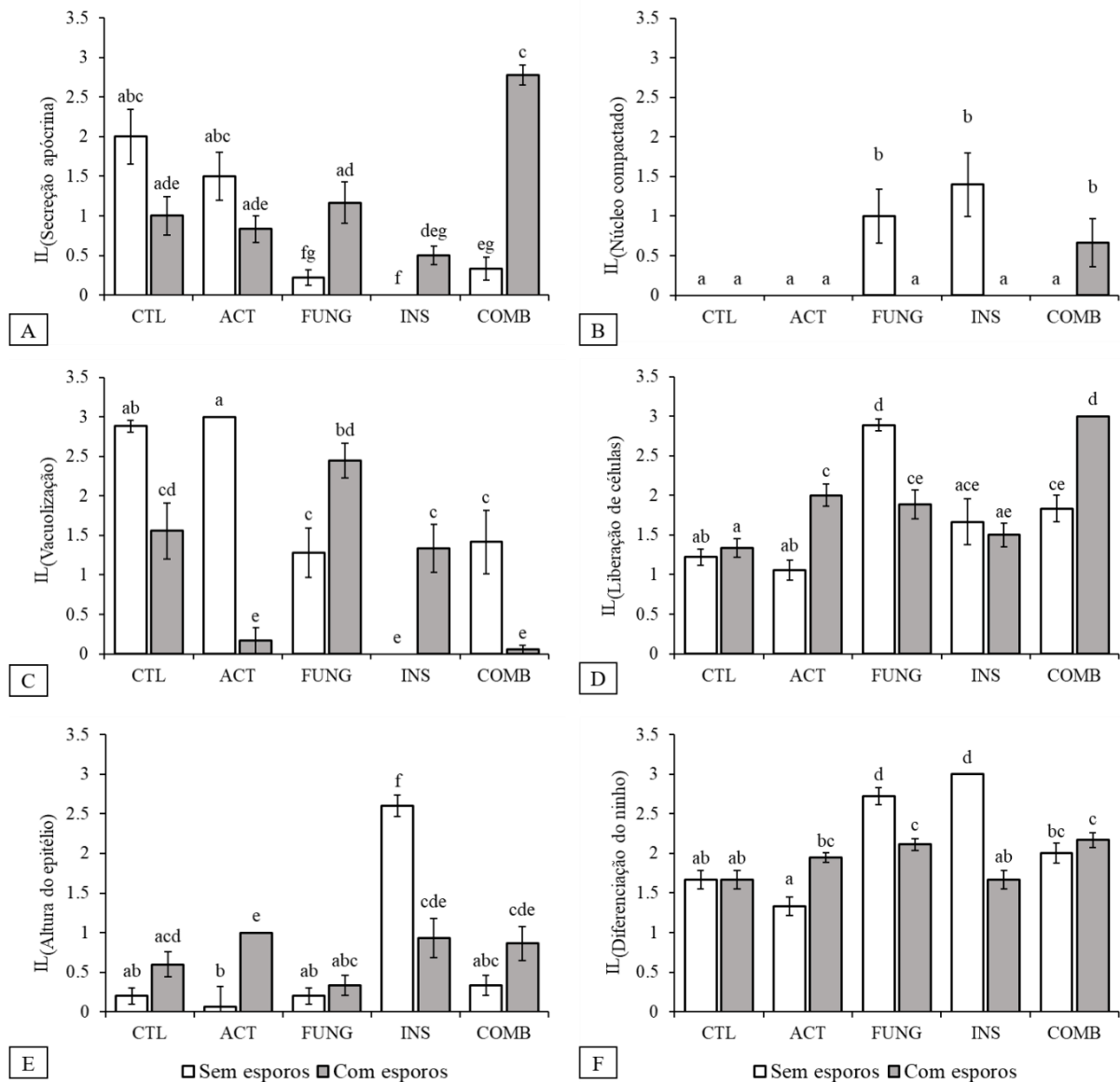
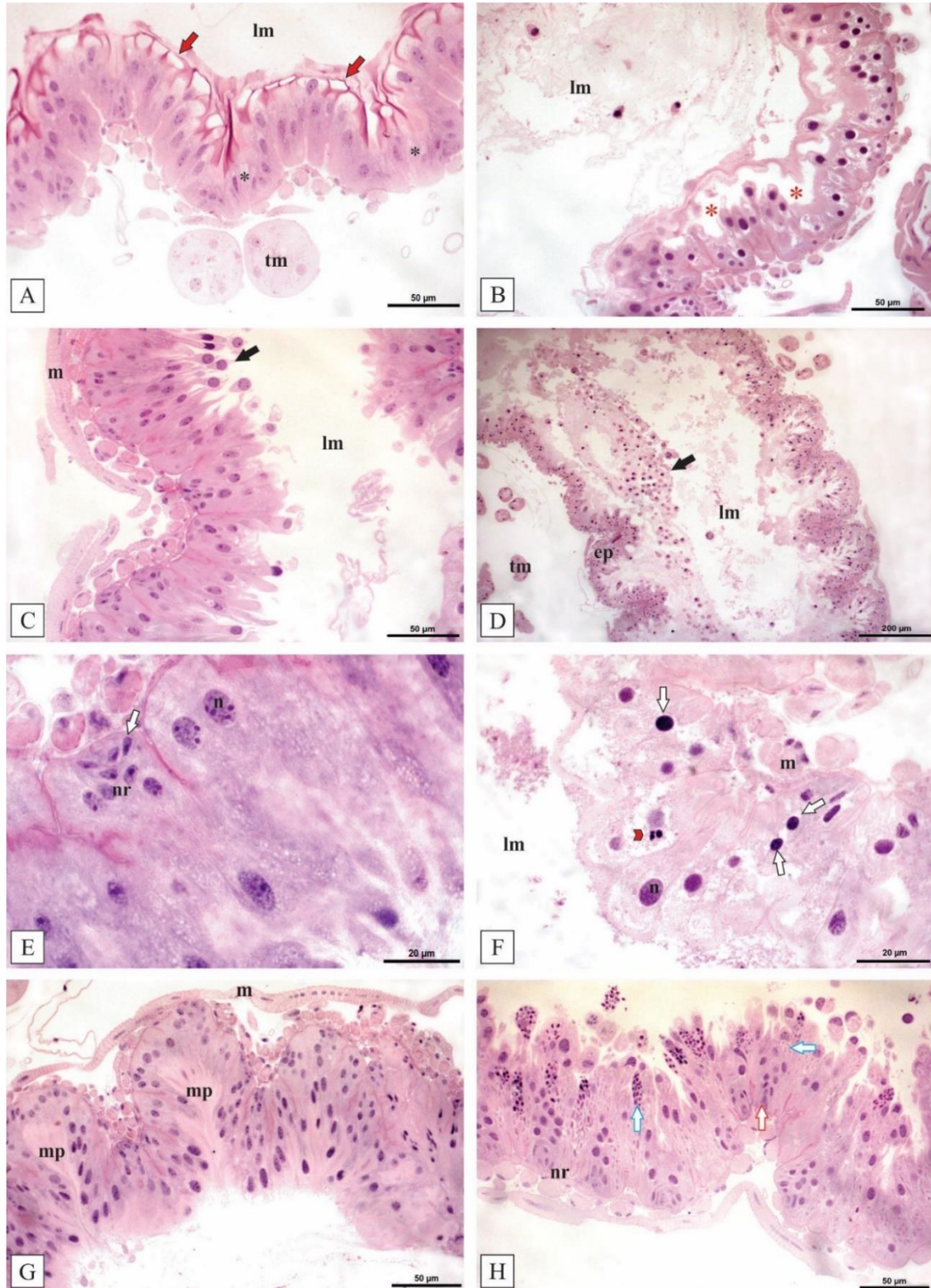


FIGURA 17. Alterações morfológicas observadas no epitélio ventricular de *Apis mellifera*. A) Secreção apócrina (seta vermelha) e pequenos vacúolos no citoplasma (asterisco preto); B) Área do epitélio apresentando núcleos com cromatina compactadas e grande vacuolização degenerativa (asterisco vermelho); C) Células sendo liberadas

para o lúmen (seta preta); D) Alta quantidade de células liberadas no lúmen (seta preta); E) Ninho com a presença de células regenerativas com núcleo picnótico (seta branca); F) Epitélio ventricular com núcleo da célula digestiva em picnose (seta) e com núcleo picnótico fragmentado (ponta de seta vermelha); G) Matriz peritrófica; H) Epitélio infectado por esporos de *Nosema ceranae* (seta azul) e ninho de células regenerativas em diferenciação (seta com contorno vermelho).

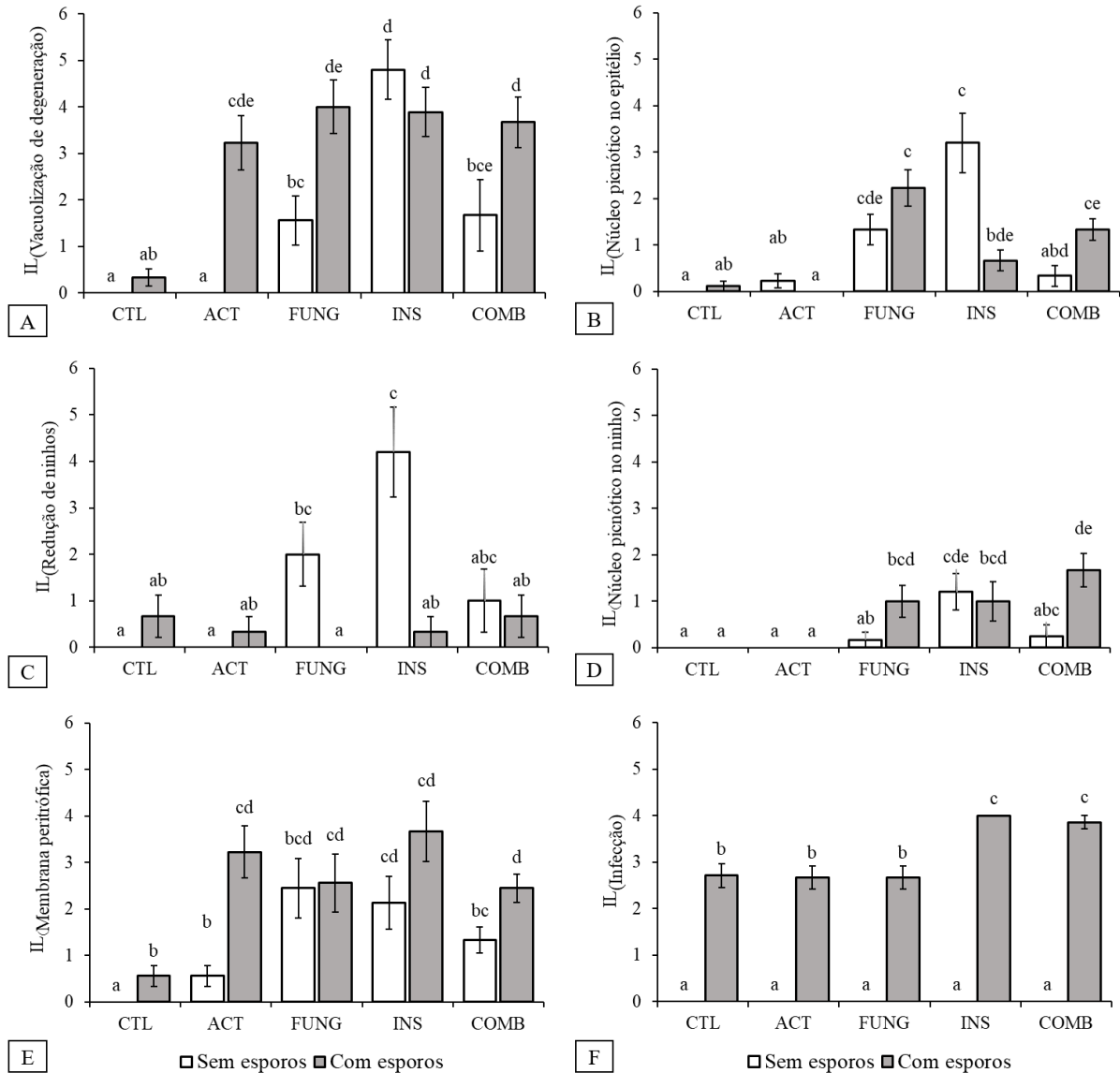


A exposição ao inseticida reduziu a espessura do epitélio do intestino médio, notada pelo aumento do índice de lesão e aumentou a diferenciação dos ninhos de células regenerativas, evidenciando a resposta do órgão ao dano. Entretanto, em combinação com o patógeno, esses efeitos não foram observados. Alterações com importância patológica moderada e severas (Figura 18), como vacuolização degenerativa, núcleo picnótico no epitélio e no ninho, redução na frequência de ninhos, e alterações estruturais (Figura 19) também foram maiores nos indivíduos do grupo INS sem esporos em comparação com o grupo CTL. A presença dos esporos de *Nosema* no grupo INS reduziu o índice de lesão dessas alterações.

Mudanças morfológicas na membrana peritrófica não diferiram entre os grupos quando em comparação ao grupo ACT + esporo, ou apresentaram índices menores que o observado nesse grupo, mas diferiram do grupo CTL e CTL + esporo (Figura 17E).

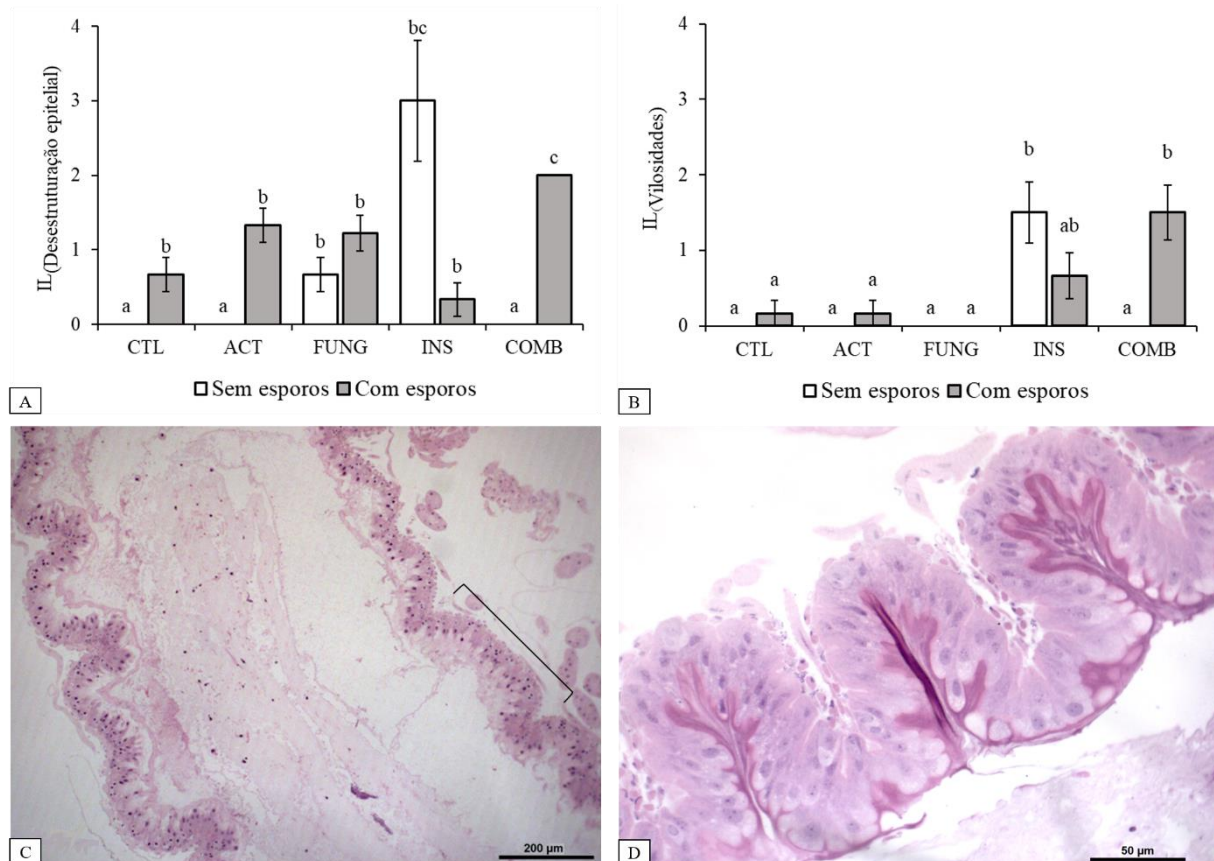
O princípio ativo do fungicida levou à condensação do núcleo celular, aumento de liberação de células para o lúmen, aumento de diferenciação de ninhos e redução no número de ninhos, aumento de vacuolização degenerativa e de núcleos picnóticos no epitélio. Contudo, em combinação com o patógeno, o número de núcleos picnóticos no ninho foi maior (Figura 18D), enquanto as outras alterações observadas tiveram um índice menor, mas maiores que os grupos controles.

FIGURA 18. Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de importância patológica moderada (média  $\pm$  erro padrão). A) Vacuolização degenerativa; B) Núcleo picnótico no epitélio; C) Redução de ninhos de células regenerativas; D) Núcleo picnótico no ninho de células regenerativas; E) Membrana peritrófica; F) Infecção com esporos de *N. ceranae*. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS). Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.



A combinação dos estressores (COMB + esporo) aumentou o índice das seguintes alterações: compactação dos núcleos ( $P = 0,04$ ), liberação de células ( $P < 0,001$ ), diferenciação de ninhos ( $P < 0,001$ ), vacuolização degenerativa ( $P = 0,03$ ), núcleos picnóticos no epitélio e no ninho ( $P = 0,02$ ), desestruturação epitelial e das vilosidades ( $P = 0,01$ ). O patógeno potencializou as alterações, contudo, não houve potencialização dos efeitos pela combinação dos agrotóxicos, visto que as alterações não diferiram daquelas observadas para seus respectivos princípios ativos isolados.

FIGURA 19. Alterações estruturais no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* (média  $\pm$  erro padrão). A) Desestruturação epitelial; B) Redução da amplitude e frequência de vilosidades; C) Secção do intestino médio com vilosidades esparsas (chave) e com baixa amplitude, mostrando desestruturação epitelial média; D) Secção do intestino médio com vilosidades frequentes e com alta amplitude (lm – lúmen, ep – epitélio). CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS). Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.



A partir da análise de correlação de Spearman (Figura 20), observou-se que algumas alterações estão fortemente correlacionadas positivamente ou negativamente, indicando que estas podem influenciar na frequência da alteração correlacionada. A presença de núcleos picnóticos no epitélio é fortemente correlacionada com a presença de núcleos picnóticos nos ninhos de células regenerativas ( $\rho = 0,75$ ;  $P = 0,001$ ) e com a compactação de núcleos ( $\rho = 0,51$ ;  $P = 0,01$ ). A vacuolização degenerativa é positivamente correlacionada com a redução da altura do epitélio ( $\rho = 0,61$ ;  $P = 0,001$ ) e com a desestruturação epitelial ( $\rho = 0,61$ ;  $P = 0,001$ ) e negativamente correlacionada com a presença de pequenos vacúolos no citoplasma ( $\rho = -0,63$ ;  $P = 0,001$ ).

FIGURA 20. Correlação de Spearman entre os índices de lesão das alterações morfológicas analisadas no intestino médio de *A. mellifera*. Vac\_norm: pequenos vacúolos no citoplasma; Sec\_ap: secreção apócrina; Inf.: infecção com esporos de *Nosema*; Lib\_cel: liberação de células para o lúmen; Pic\_ninho: núcleo picnótico no ninho; Nuc\_comp: compactação do núcleo; Esp\_ep: redução da espessura do epitélio; Vac\_deg: vacuolização degenerativa; Desest: desestruturação epitelial; Vil: vilosidades; Esp\_mp: espessura membrana peritrófica; Dif\_nin: diferenciação do ninho; F\_ninho: redução de ninhos. \* P=0,05; \*\* P=0,01; \*\*\* P=0,001.

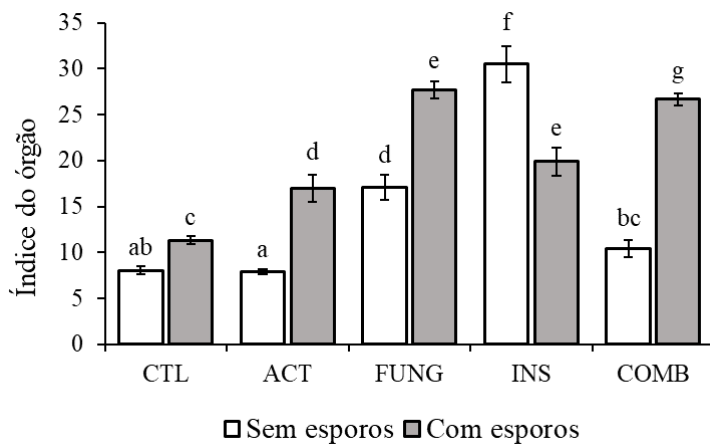


Fonte: Análise usando o pacote PerformanceAnalytics. Brian G. Peterson and Peter Carl (2019). PerformanceAnalytics: Econometric Tools for Performance and Risk Analysis. R package version 1.5.3.



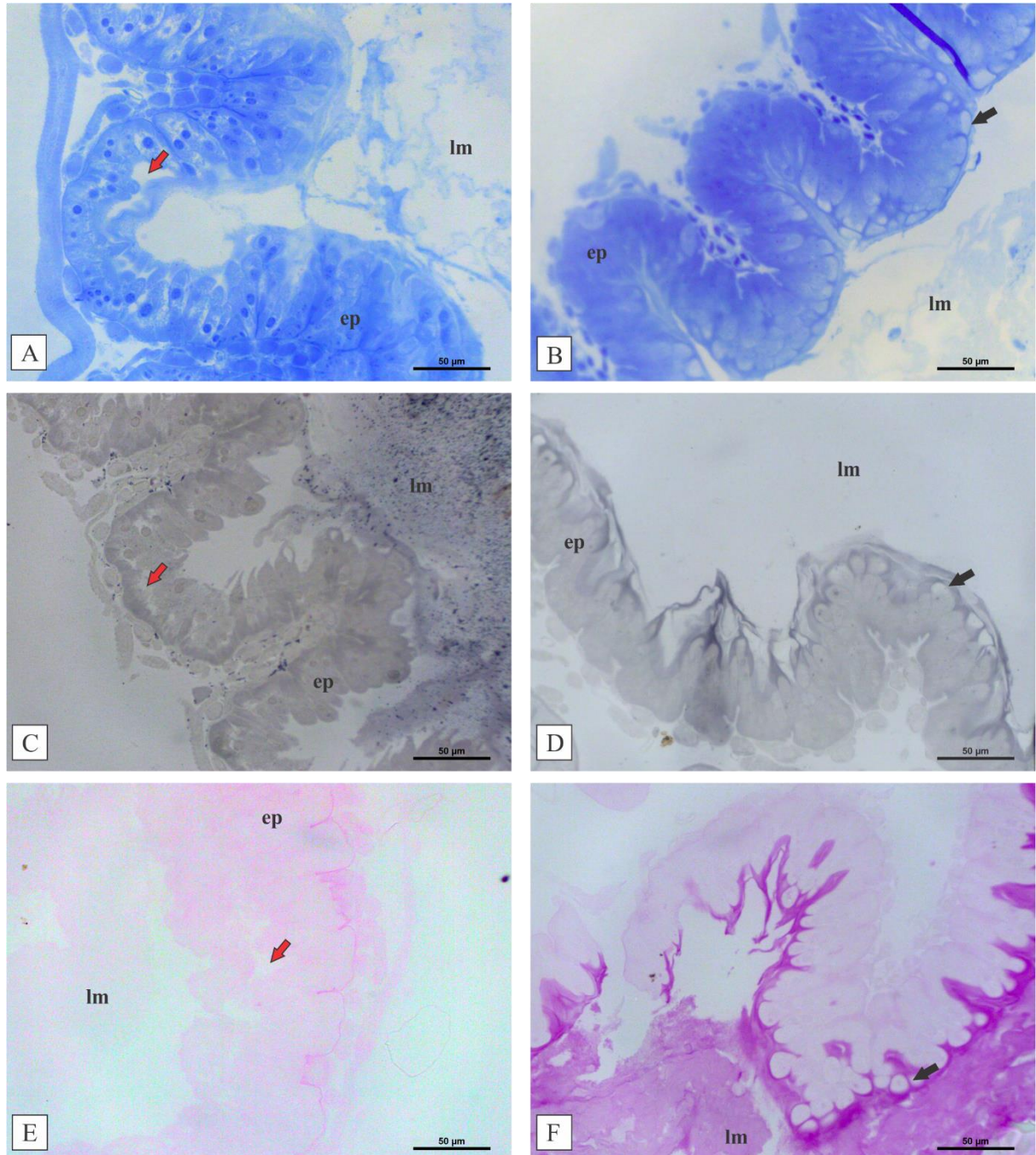
O índice total de lesão no órgão ( $I_{org}$ ) foi maior em todos os grupos experimentais expostos inoculados com o patógeno e nos grupos INS e FUNG sem esporos em comparação com o grupo controle (Figura 21,  $P < 0,001$ ). A presença do patógeno aumentou o  $I_{org}$  em todos os grupos experimentais, com exceção do INS que na presença do patógeno o  $I_{org}$  foi menor, similar ao ACT + esporo. A visão geral do intestino médio de cada grupo experimental está representada pelas figuras 22 a 25 (Apêndice 2).

FIGURA 21. Índice total de lesão no intestino médio de *A. mellifera* (média  $\pm$  erro padrão). CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG – fungicida, INS – inseticida, COMB – combinação (FUNG+INS). Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.



A secreção apócrina e os locais com vacuolização de degeneração resultaram em marcação negativa para proteínas (Figura 26 A e B), lipídios (Figura 26 C e D) e gliconjugados neutros (Figura 26 E e F).

FIGURA 26. Técnicas histoquímicas para marcação de proteínas, lipídios e gliconjugados nas alterações morfológicas no epitélio ventricular de abelhas adultas evidenciando vacuolização de degeneração (seta vermelha) e secreção apócrina (seta preta). A e B) Reação com azul de bromofenol para marcação de proteínas totais. C e D) Coloração com Sudam Black para marcação de lipídeos; E e F) Reação de PAS para marcação de gliconjugados. ep: epitélio ventricular; lm: lúmen; m: musculatura, tm: túbulo de Malpighi, seta: secreção apócrina.



#### 2.3.4 Reação de Tunel

Os grupos controles CTL, ACT, ACT + esporo e o controle negativo da reação não apresentaram marcação positiva para fragmentação do DNA nuclear nas células digestivas e

nas células dos ninhos de diferenciação no epitélio ventricular (Figura 27B e 27B), no CTL + esporo foi observado apenas uma célula positiva (Figura 28B). Dentre os grupos expostos, o COMB + esporo foi o único no qual não foi observado núcleo celular com marcação positiva.

Nas secções do INS sem esporo além de núcleos com marcação positiva para fragmentação do DNA (Figura 27E), foram observados fragmentação do núcleo (Figura 29B). No FUNG e COMB, ambos sem esporo, houve marcação positiva para núcleos de células na região de diferenciação celular (Figura 27, D e F, respectivamente). Nos demais grupos não houve marcação positiva na região dos ninhos, apenas em células digestivas do epitélio. Apenas no grupo COMB sem esporo, foi observado células musculares com núcleos positivos para fragmentação do DNA (Figura 29, C e D). O INS + esporo e COMB sem esporo apresentaram uma frequência menor de células positivas para fragmentação do DNA que os demais grupos.

FIGURA 27. Reação de Tunel no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e sem inoculação de esporos de *Nosema ceranae* na fase adulta. A) Epitélio ventricular sem exposição aos agrotóxicos com núcleos marcados com Dapi; B) Reação de Tunel com marcação negativa nos grupos controle; C) Epitélio ventricular com exposição aos fungicida com núcleos marcados com Dapi D) Reação de Tunel com marcação positiva no epitélio ventricular exposto ao fungicida; E) Reação de Tunel com marcação positiva no epitélio ventricular exposto ao inseticida; F) Reação de Tunel com marcação positiva no epitélio ventricular exposto a combinação de agrotóxicos. ep: epitélio, lm: lúmen, tm: túbulo de Malpighi, seta branca = marcação positiva da reação de Tunel em célula digestiva, seta azul = marcação positiva da reação de Tunel na região de diferenciação, seta vermelha = marcação positiva da reação de Tunel em célula liberada no lúmen.

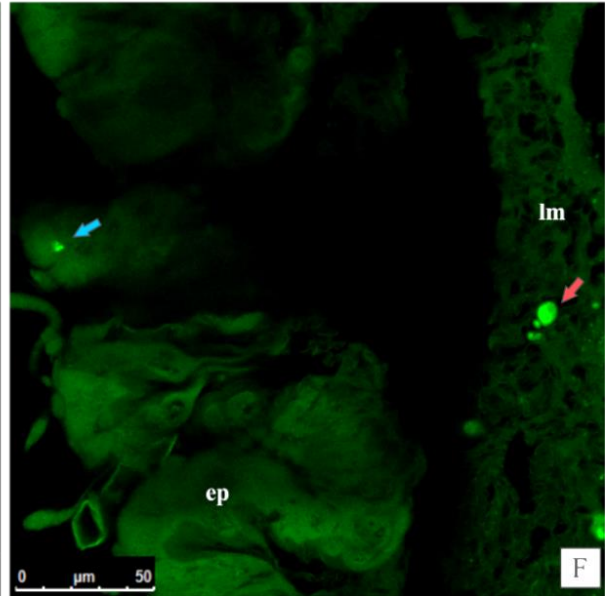
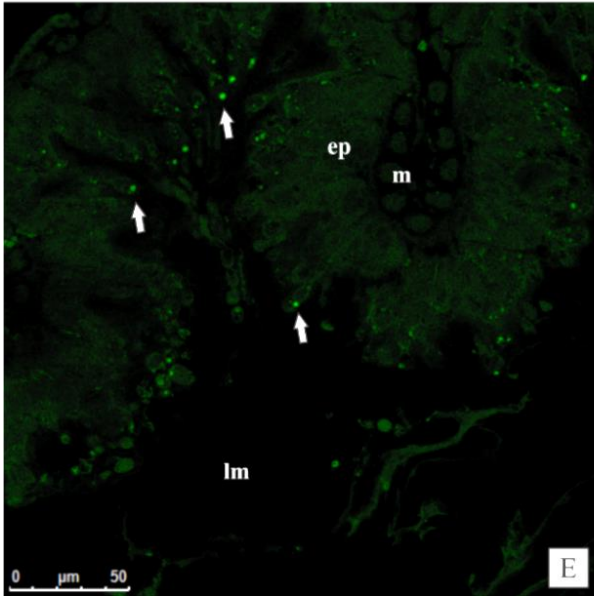
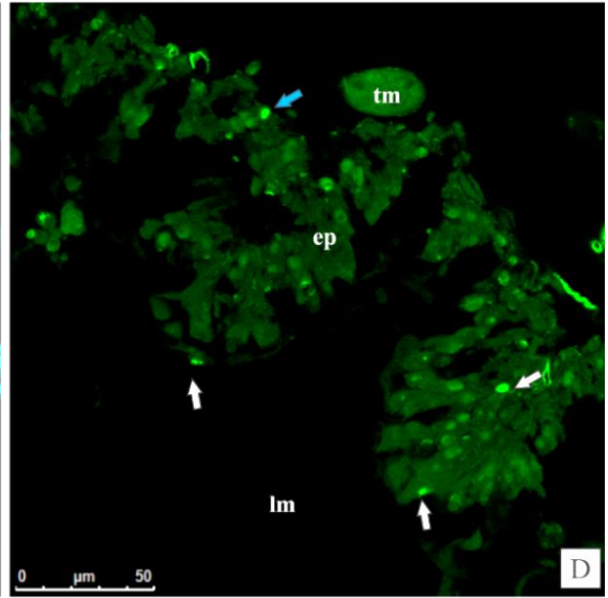
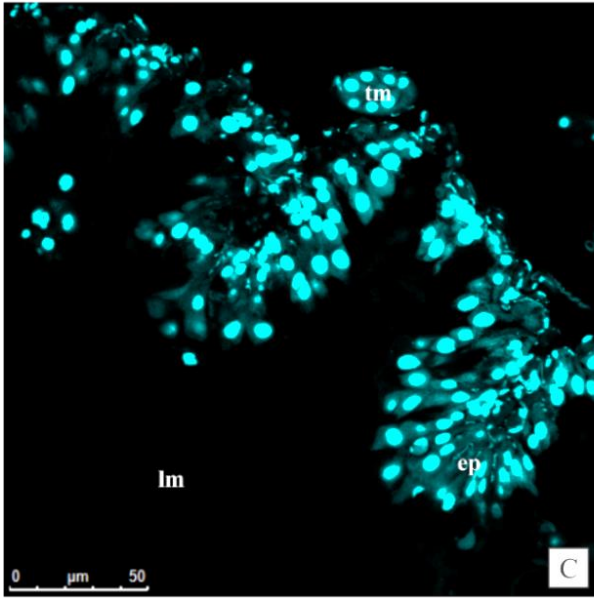
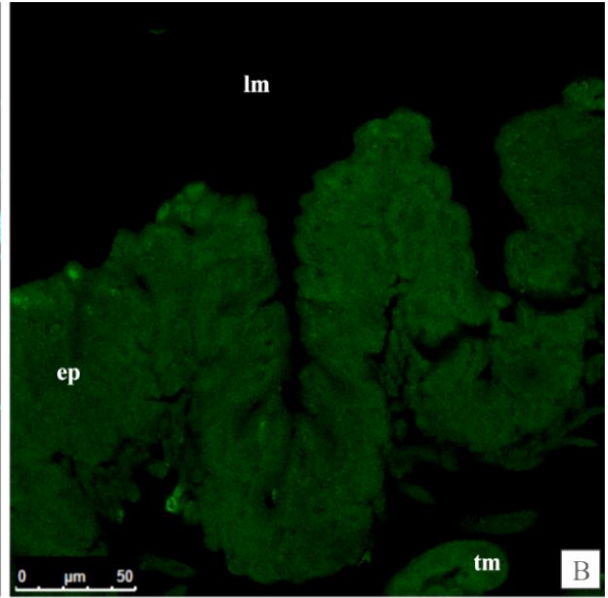
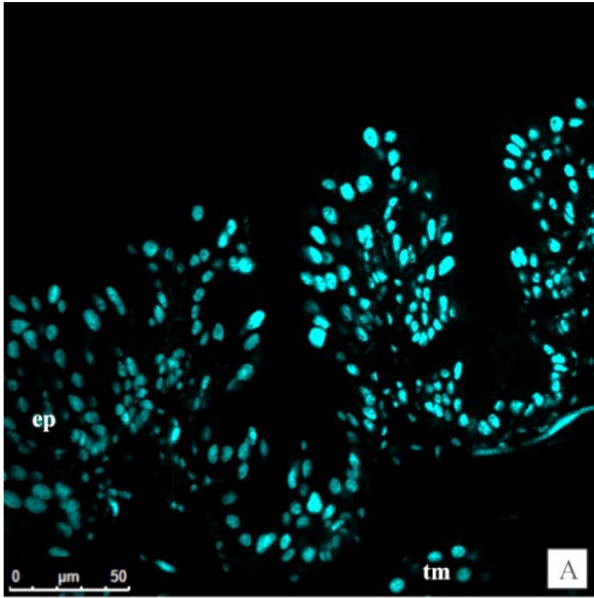


Figura 28. Reação de Tunel no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e com inoculação de esporos de *Nosema ceranae* na fase adulta. A) Epitélio ventricular sem exposição aos agrotóxicos com núcleos marcados com Dapi; B) Reação de Tunel no epitélio ventricular do grupo controle; C) Epitélio ventricular com exposição aos fungicida com núcleos marcados com Dapi D) Reação de Tunel com marcação positiva no epitélio ventricular exposto ao fungicida; E) Reação de Tunel com marcação positiva no epitélio ventricular exposto ao inseticida; F) Reação de Tunel com marcação positiva no epitélio ventricular exposto a combinação de agrotóxicos. ep: epitélio, lm: lúmen, tm: túbulo de Malpighi, seta branca = marcação positiva da reação de Tunel em célula digestiva, seta amarela = esporos de *Nosema ceranae*, seta vermelha = marcação positiva da reação de Tunel em célula liberada no lúmen.

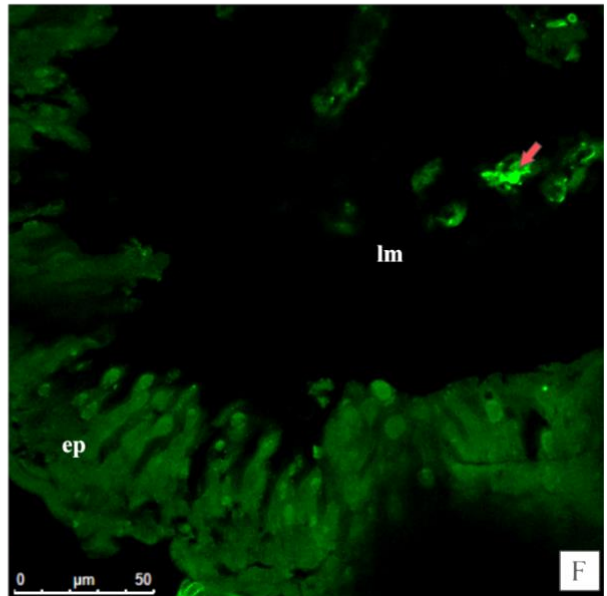
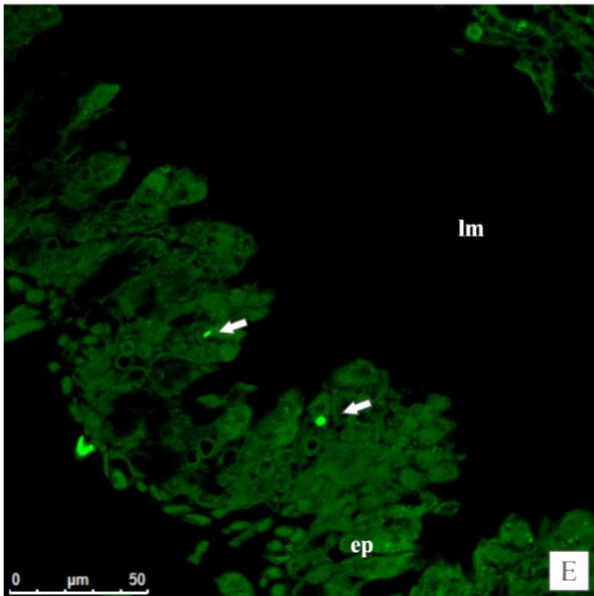
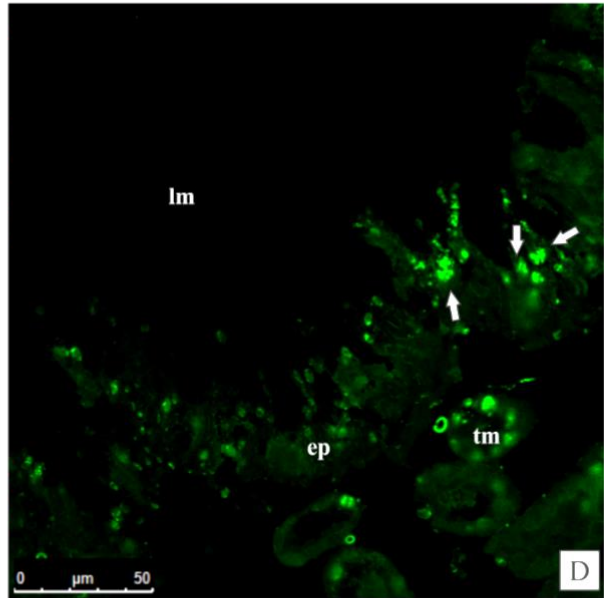
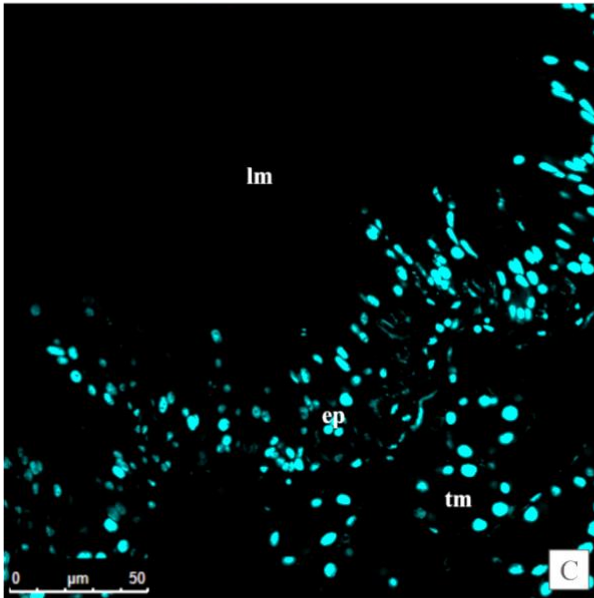
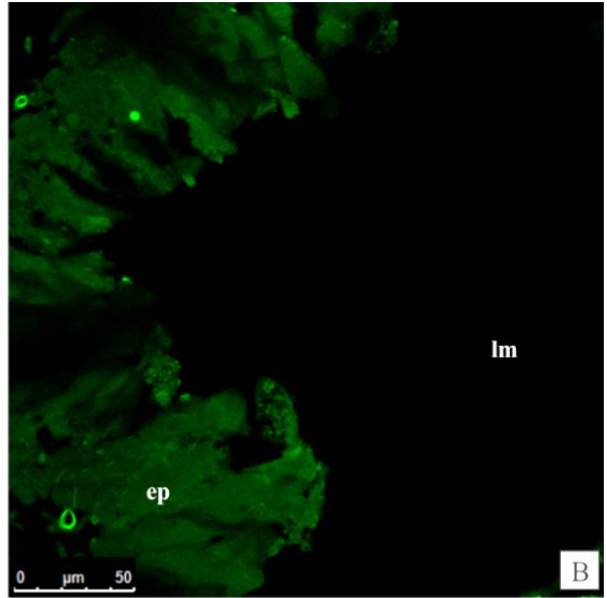
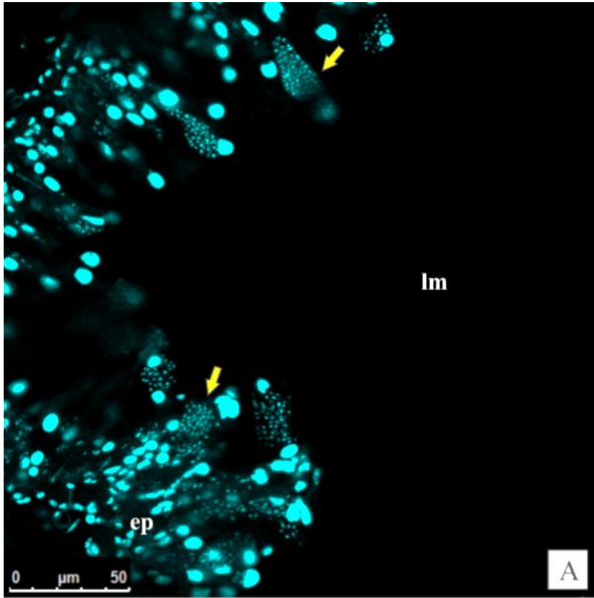
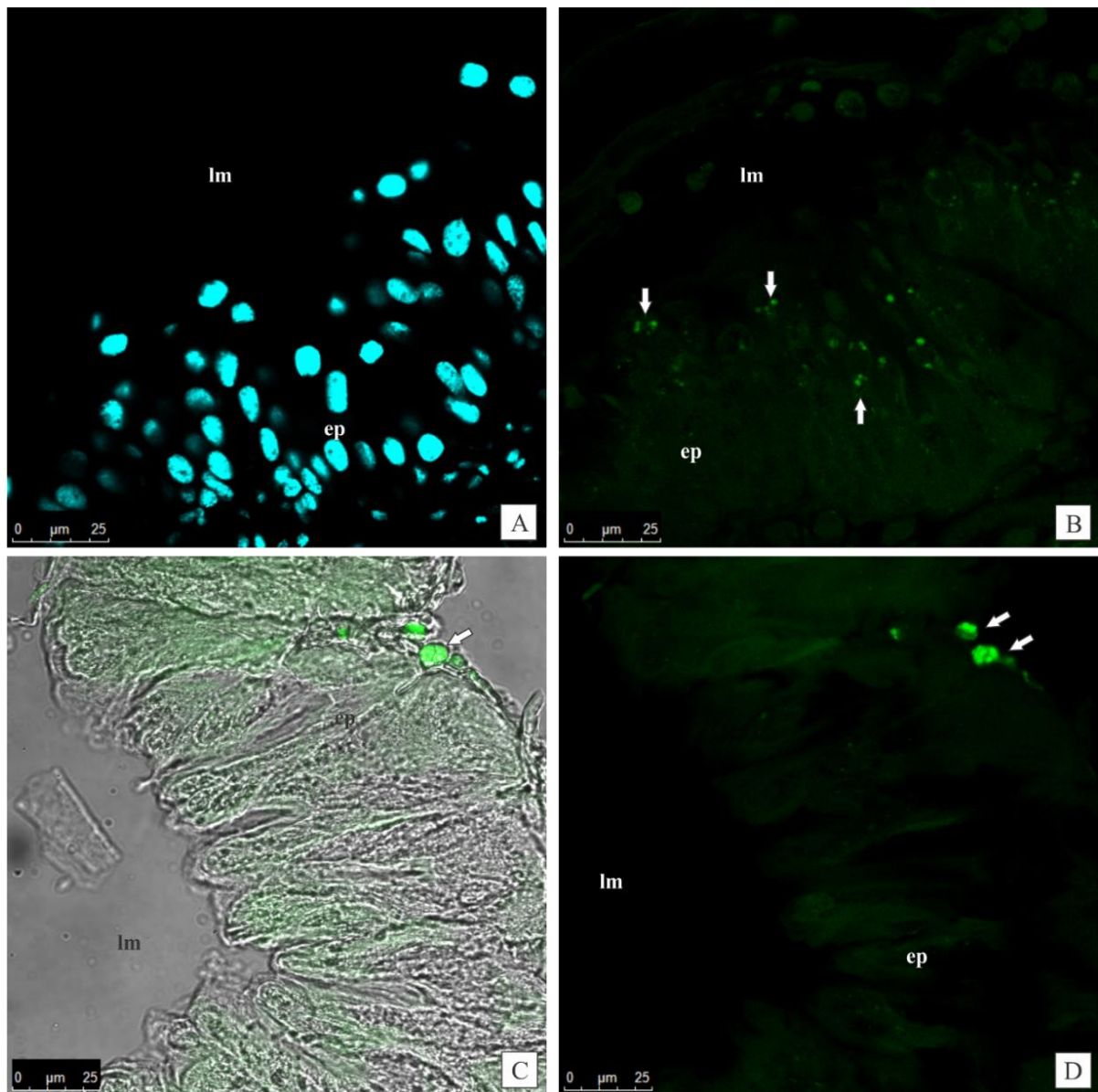


Figura 29. Reação de Tunel no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval. A) Epitélio ventricular com exposição ao inseticida com núcleos marcados com Dapi; B) Epitélio ventricular com exposição ao inseticida evidenciando núcleos com fragmentação (seta) marcado pela reação de tunel; C e D) Epitélio ventricular com exposição ao inseticida e fungicida evidenciando núcleos de músculo marcado pela reação de túnel. ep: epitélio, lm: lúmen, tm: túbulo de Malpighi.



## 2.4 DISCUSSÃO

Observou-se que a presença dos princípios ativos clotianidina (0,17 ng/larva,  $C=0,0014$  ng/ $\mu$ L) e piraclostrobina (0,69 ng/larva,  $C=0,0049$  ng/ $\mu$ L) no alimento larval de abelhas, não afetou o desenvolvimento pós-embrionário das abelhas, como também foi observado por outros

estudos com exposição larval à clotianidina (NICHOLLS *et al.*, 2017; TADEI *et al.*, 2019) e ao piraclostrobina (TADEI *et al.*, 2019) em concentrações similares as utilizadas neste trabalho.

A ausência de efeitos detectáveis durante o desenvolvimento larval dos indivíduos expostos ao inseticida neonicotinóide clotianidina não se estende a todos os neonicotinóides. Tavares *et al.* (2017) observaram redução na sobrevivência de larvas expostas a 1,44 ng/ $\mu$ L de tiametoxam e na sobrevivência de pupas expostas a 0,001 e 1,44 ng/ $\mu$ L. Rosa *et al.* (2016) também observaram diminuição no tempo de sobrevivência larval de *Scaptotrigona aff. depilis* Moure, 1942 quando expostas à 0,044 ng/ larva de tiametoxam.

A melanização observada durante o desenvolvimento larval, em todos os grupos experimentais, é uma resposta de defesa do organismo mediada por hemócitos e catalisada pela fenoloxidase quando há presença de patógeno (BRANDT *et al.*, 2016). Como a frequência de anomalias diferiram entre as colônias, provavelmente, as larvas de primeiro instar transferidas já possuíam alguns patógenos virais, entre eles o DWV – vírus da asa deformada, que podem resultar em asa deformadas em abelhas recém-emergidas (DEGRANDI-HOFFMAN; CHEN, 2015) e o ABPV – vírus da paralisia aguda em abelha, ambos detectados por Carneiro *et al.* (2015) nas colônias utilizadas nesse estudo. Redução de hemócitos e aumento de melanização foram observadas em abelhas adultas expostas apenas a doses mais elevadas de clotianidina (0,1 ng/ $\mu$ L) (BRANDT *et al.*, 2016).

A observação de alterações morfológicas moderadas e severas no intestino médio de abelhas adultas indicam um armazenamento de xenobióticos durante a fase larval e a mobilização desses durante a metamorfose (FENG *et al.*, 2017; TADEI *et al.*, 2019), o que pode ter interferido de alguma forma na remodelação do intestino médio larval para formação do intestino médio do adulto.

A presença de secreção apócrina e de pequenos vacúolos no citoplasma do epitélio ventricular são resultantes de atividades de síntese de moléculas e liberação de secreção realizada pelas células digestivas (CRUZ-LADIM, 2009), mostrando que os intestinos dos grupos controles estavam em alta atividade celular. No estudo de Cruz-Ladim, Serrão e Silva-Moraes (1996), a secreção apócrina observadas em operárias de *A. mellifera* foram denominadas protusões no citoplasma apical, as quais os autores sugerem serem resultantes de regulação osmótica e/ou secreção de macromoléculas constituintes da membrana peritrófica e liberação de enzimas digestivas que ficarão alojadas nesta matriz. No presente estudo, nos grupos expostos, essas características (presença de secreção apócrina e de pequenos vacúolos no citoplasma) não foram observadas. Provavelmente os agrotóxicos afetaram a função secretora das células digestivas, as quais possivelmente reduziram suas atividades metabólicas



de síntese de forma que o gasto energético fosse desviado para os mecanismos de desintoxicação (BADIOU-BÉNÉTEAU *et al.*, 2012; BERENBAUM; JOHNSON, 2015), como estratégia de defesa para que o intestino pudesse compensar o estresse causado pelo xenobiótico.

Outro mecanismo de defesa do órgão é a eliminação de células danificadas pelo estressor. Quando em contato com um estressor, a liberação de células para o lúmen do intestino, processo natural do órgão, pode ser acentuada (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Frente a isso, o organismo da abelha sinaliza a diferenciação de ninhos de células regenerativas para repor as células digestivas liberadas para o lúmen intestinal (CRUZ-LADIM, 2009), confirmada pela correlação positivas entre elas observada no presente estudo. Se o fator estressor persiste, a diferenciação nos ninhos continua a fim de reverter os danos no epitélio do intestino, levando à redução de ninhos de células regenerativas como resultado da diferenciação total destes, pois as células regenerativas não se dividem na abelha adulta e, assim, reduzem-se em número conforme ocorre a substituição de células desgastadas e/ou danificadas (CRUZ-LADIM, 2009). Apesar de não ter sido observada uma quantidade maior de células liberadas no lúmen dos indivíduos expostos ao inseticida, estes apresentaram elevada diferenciação com consequente redução dos ninhos, indicativos do processo de substituição de células epiteliais, podendo estar relacionadas com a desestruturação epitelial e redução da espessura epitelial do intestino observadas neste grupo.

A redução de ninhos regenerativos e presença de núcleos picnóticos nas células imaturas dos ninhos apontam que o inseticida neonicotinóide clotianidina reduz a capacidade regenerativa do epitélio. Esses efeitos também foram observados no intestino médio de abelhas expostas à outros neonicotinóides (GREGORC; ELLIS, 2011; GRELLA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A clotianidina compete com a acetilcolina pelos receptores nicotínicos da acetilcolinesterase no sistema nervoso do inseto (GYŐRI *et al.*, 2017). No estudo de Kim *et al.* (2012) com *A. mellifera*, os autores constataram que a abelha possui dois homodímeros de acetilcolinesterase, um predominantemente expresso nos gânglios e cérebro (sistema nervoso central - SNC) que desempenha principalmente transmissão sináptica e são os principais alvos de inseticidas neurotóxicos e o outro presente no SNC e também nos tecidos não neurais (tórax, abdômen e pernas), realizando funções de defesa de xenobióticos ao se ligar inespecificamente em uma variedade de xenobióticos, principalmente inseticida organofosforados e carbamato, reduzindo a inibição da acetilcolinesterase de transmissão sináptica.

Durante a fase larval, os níveis de expressão da acetilcolinesterase e quantidade de células Kenyon, que contém os receptores de acetilcolina, são baixos, sendo intensificados durante o estágio pupal (THANY *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2012). Desse modo, a ação do inseticida sobre as abelhas, em doses subletais, ocorrem a partir da metamorfose (TAVARES *et al.*, 2017), quando este possivelmente é mobilizado do corpo gorduroso e passa a ficar disponível na hemolinfa, atingindo o órgão alvo e expondo o indivíduo à ação do princípio ativo do agrotóxico.

Quando exposto a um fator estressor, o inseto tende a mobilizar energia para combatê-lo (EVEN; DEVAUD; BARRON, 2012), assim mesmo sendo o alvo o SNC, as funções digestivas no intestino da abelha podem ser afetadas durante o processo de absorção das moléculas dos agrotóxicos presentes no alimento ingerido pela abelha, seja na fase de larva ou de adulto. Os danos no intestino médio podem também ser resultantes da citotoxicidade da clotianidina nas células regenerativas do intestino larval, órgão de primeiro contato ao agrotóxico e/ou proveniente do estresse ocasionado pelo aumento da atividade da acetilcolinesterase na fenda sináptica quando na presença de um neonicotinóide (GYŐRI *et al.*, 2017). Durante a metamorfose, o intestino médio larval é remodelado, sendo reabsorvido e substituído por células regenerativas (CRUZ-LADIM, 2009), através de um equilíbrio entre proliferação e morte celular (GONÇALVES *et al.*, 2017). Friol *et al.* (2017) sugerem que a exposição larval a um neonicotinóide causa danos nas células regenerativas, levando a alterações estruturais nas futuras células digestivas do intestino médio das abelhas adultas que se diferenciam durante a metamorfose. A exposição à neonicotinóides em abelhas adultas também resultou em citotoxicidade no intestino médio, aumentando a morte celular (GREGORC *et al.*, 2016). Todos esses mecanismos podem estar associados as alterações morfológicas observadas no intestino médio; porém, estudos futuros são necessários para confirmar como o neonicotinóide afeta órgãos não-alvos em nível celular.

Levando em consideração a hipótese da mobilização do composto químico armazenado nos tecidos que ocorre durante a metamorfose, o inseticida pode prejudicar regiões cerebrais responsáveis pela visão, orientação (TAVARES *et al.*, 2015) e funções olfativas (PENG; YANG, 2016; YANG *et al.*, 2012) e reduzir sinapses no cérebro, levando a distúrbios neurofisiológicos (TAVARES *et al.*, 2019) os quais poderiam ser detectados posteriormente no indivíduo adulto.

Adicionalmente, o inseticida também induziu o aumento de morte celular no epitélio ventricular, a qual foi marcada pelos núcleos picnóticos e fragmentação do DNA, indicativos de apoptose (ELMORE, 2007) e perda citoplasmática em áreas extensas (degeneração

vacuolar), que podem ser resultantes de morte celular por exacerbação do processo de autofagia (GRELLA *et al.*, 2019). Mudanças essas correlacionadas com as alterações estruturais do órgão (redução da espessura do epitélio e alteração do padrão das vilosidades – frequência e amplitude menor) que afetam sua função de absorção e digestão, prejudicando a saúde da abelha.

Em combinação com o patógeno *Nosema*, os danos no epitélio ventricular causado pelo inseticida foram reduzidos (GREGORC *et al.*, 2016). Após seis dias da inoculação com esporos de *N. ceranae*, a infecção já se espalhou por todo o epitélio e a presença de uma frequência maior de esporos maduros é observada (HIGES *et al.*, 2007); porém, esporos imaturos são os mais frequentes (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009), como observado neste estudo. Devido a maior taxa de infecção e ao número maior de esporos maduros na região posterior do intestino médio, sugere-se que a infecção por *N. cerane* inicia-se nas regiões mais posteriores do intestino médio e, em seguida, se espalha para a região anterior, de forma semelhante ao observado em *N. apis* (FRIES, 1988). A partir de sete dias de infecção, as células epiteliais do intestino apresentam sinais mais intensos de degeneração (HIGES *et al.*, 2007). Portanto, a análise histopatológica das abelhas no sexto dia após a infecção, no presente estudo, permitiu analisar a citoarquitetura tecidual do intestino médio antes da entrada na fase subsequente, quando a degeneração induzida pelo patógeno poderia mascarar a caracterização dos efeitos histopatológicos induzidos pelos agrotóxicos ingeridos na fase larval de forma combinada a inoculação do patógeno na fase adulta. Adicionalmente, no final do ciclo do patógeno (oito a dez dias), quando os esporos estão maduros, ocorre a lise celular para liberação dos esporos no lúmen do intestino (FRIES *et al.*, 1996), e a estrutura do epitélio é totalmente modificada, sendo difícil a visualização de ninhos de células regenerativas (PANEK *et al.*, 2018), cuja resposta a exposição aos agrotóxicos e a infecção por *Nosema* traz importante contribuição para a compreensão dos seus efeitos combinados.

A estratégia de sobrevivência e proliferação de *Nosema* nas células intestinais pode explicar a redução de danos no intestino exposto ao inseticida quando também em contato com o patógeno, o qual interfere nas vias de morte celular e mantém a célula infectada viva (GREGORC *et al.*, 2016). Durante a propagação dos esporos, o patógeno modifica o metabolismo do hospedeiro, aumentando a disponibilidade de nutrientes (VIDAU *et al.*, 2014), e inibindo a apoptose (KURZE *et al.*, 2015, 2018), favorecendo assim o desenvolvimento e maturação dos esporos (HIGES *et al.*, 2013). A redução de células positivas à fragmentação do DNA também foi observada no grupo COMB com esporos, corroborando com as observações que *N. cerane* reduz a apoptose.

O patógeno também diminuiu as alterações epiteliais dos indivíduos expostos ao fungicida, com exceção da presença de núcleos picnóticos nos ninhos de células regenerativas que foram potencializadas, levando a um maior índice de lesão do órgão. Esses indivíduos também apresentaram a maior taxa de esporos maduros no epitélio. Dentre os efeitos mais tardios (a partir de 7 dias de infecção) causados pela infecção com os esporos de *N. ceranae* estão a redução da capacidade de regeneração (re-epitelização) do intestino médio (DUSSAUBAT *et al.*, 2012; PANEK *et al.*, 2018). Desse modo, o fungicida parece ter acelerado o ciclo de desenvolvimento do patógeno, mas isso não resultou numa maior taxa de infecção.

O aumento da taxa de infecção celular nos grupos expostos ao inseticida e co-expostos (fungicida + inseticida) e o aumento de esporos maduros aos indivíduos expostos ao fungicida sugerem que a exposição de *A. mellifera* a doses subletais em fases iniciais do desenvolvimento pode deixá-las mais susceptíveis aos efeitos de *Nosema ceranae*. Como esporos imaturos não são observados na contagem pela câmara de Newbauer (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2009) e, após seis dias da inoculação os esporos de *N. ceranae* estão majoritariamente nesta fase, este aumento não foi observado por esse método de quantificação utilizado.

O aumento da infecção de *Nosema* foi observado por Pettis *et al.* (2012) em colônias expostas a baixas doses do neonicotinoide imidacloprido. Os autores sugerem que a exposição ao neonicotinóide contaminou o alimento larval afetando as vias intestinais durante este estágio de desenvolvimento e resultou na maior taxa de infecção por *Nosema* no adulto. Esse mesmo efeito foi observado após a exposição de larvas à clotianidina no presente estudo. Em contato com agrotóxicos, a imunocompetência das abelhas pode ser prejudicada (BRANDT *et al.*, 2016; PRISCO *et al.*, 2013), acarretando na menor eficiência no combate de patógenos (POQUET; VIDAU; ALAUX, 2016).

Os baixos níveis de esporos observados pela contagem na câmara de Newbauer nos grupos que não foram inoculados com o patógeno podem ser resultantes da presença de esporos na geleia real (TRAVER; FELL, 2012) oferecida durante a alimentação larval. Esporos de *Nosema* podem ser transmitidos por meio de trofalaxia entre abelhas (SMITH, 2012) e pelo consumo de alimentos contaminados com os esporos (HIGES *et al.*, 2008), possivelmente por contaminação fecal. Dessa forma, regiões das glândulas hipofaríngeas e canais alimentares podem conter esporos maduros livres e contaminar o alimento larval produzido nessas regiões (CHEN *et al.*, 2009; GISDER *et al.*, 2010). Entretanto, essas quantidades são baixas e insuficientes para causar infecção no intestino médio, confirmada pela ausência de células infectadas nos grupos não inoculados. Segundo Forsgren e Fries (2010), cargas de 1.000

esporos/abelha podem levar à infecção de algumas abelhas adultas de *A. mellifera* europeia, porém a infecção ocorre majoritariamente quando há a ingestão de quantidade iguais ou superiores à  $10^4$  esporos de *N. ceranae*.

Apesar das abelhas não serem organismo alvos, o fungicida apresentou citotoxicidade no intestino médio do inseto, potencializando alterações indicativas de morte celular (perda citoplasmática extensa, núcleos picnótico e fragmentação do DNA) e desgaste de células. Outros estudos mostraram efeitos deletérios deste fungicida no comportamento e em células de glândulas hipofaríngeas (ZALUSKI; JUSTULIN; ORSI, 2017). Danos no intestino médio dos adultos causado pelo piraclostrobina presente no alimento da larva ainda não tinham sido reportados, mas estas alterações podem prejudicar a absorção de nutrientes (CARNEIRO *et al.*, 2015; MAIOLINO *et al.*, 2014) e estar associados com as modificações nos padrões comportamentais observados por outros estudos em abelhas expostas aos fungicidas (ARTZ; PITTS-SINGER, 2015; TADEI *et al.*, 2019; TARNO; WICAKSONO; BEGLIOMINI, 2018).

O fungicida piraclostrobina atua na inibição da respiração mitocondrial de fungos (BALBA, 2007). O modo de ação desse composto em abelhas ainda não é conhecido, entretanto algumas evidências sugerem que este possa agir também nas mitocôndrias dos insetos devido à redução de níveis de ATP no músculo torácico (DEGRANDI-HOFFMAN *et al.*, 2015) e redução da taxa de consumo de oxigênio e da taxa respiratória nas mitocôndrias do músculo de voo das abelhas (CAMPBELL *et al.*, 2016) em abelhas expostas ao fungicida Pristine constituído pelos princípios ativos piraclostrobina e boscalide. Entretanto, estudos futuros são necessários para confirmar se as reduções de ATP observadas são devido a inibição enzimas transportadoras de elétrons da mitocôndria.

A redução dos efeitos deletérios resultantes da co-exposição larval ao inseticida clotianidina e ao fungicida piraclostrobina foi mostrada por Tadei *et al.* (2019) a partir da análise de sobrevivência das abelhas adultas subsequentes. Essa redução de toxicidade também foi observada na avaliação de lesões no intestino médio, em combinação, a clotianidina e o piraclostrobina possuem efeitos interativos antagonísticos.

Com base na espectroscopia FTIR dos dois princípios ativos (Figura 30, Apêndice 3), não foi evidenciada uma possível reação entre os compostos que possa resultar na redução da toxicidade dos compostos em conjunto, mas é plausível que tenha ocorrido uma interação entre eles quando colocados em mistura. Desse modo, a maior quantidade de moléculas do fungicida, devido à concentração mais alta deste composto frente à concentração do inseticida, pode ter interagido com as moléculas do inseticida de modo a diluir os seus efeitos citotóxicos, visto que o fungicida apresentou menor citotoxicidade em comparação ao inseticida. Assim, o número de

moléculas do inseticida disponíveis para agir como antagonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina foi menor.

Além disso, a presença dos dois agrotóxicos em conjunto pode ter potencializado as ações no sistema imune na abelha e reduzido os danos, entretanto ainda não está claro como esta combinação causou menores efeitos aos indivíduos. Segundo Poquet, Vidau e Alaux (2016), a interação entre agrotóxicos diferentes pode ocorrer nos locais alvos de ação, pouco provável nesse estudo devido aos modos de ações diferentes dos agrotóxicos usados; ou no mecanismo de desintoxicação da abelha. Futuras avaliações nas atividades de enzimas de desintoxicação podem auxiliar na compreensão desse mecanismo.

Contudo, quando os indivíduos co-expostos tiveram contato com o patógeno, essa redução dos efeitos deletérios não ocorreu. Pode se afirmar que o patógeno aumentou as lesões no intestino médio, possuindo um efeito sinérgico à exposição aos agrotóxicos. Portanto, apesar do patógeno reduzir algumas alterações de menor importância patológica, ele potencializou o aumento de outras com importância patológica maior, referentes à capacidade regenerativa do epitélio intestinal. Ambos os agrotóxicos apresentaram citotoxicidade ao intestino médio das abelhas, sendo o inseticida neonicotinóide o mais citotóxico. Em condições naturais, as abelhas estão expostas a uma ampla diversidade de agrotóxicos e patógenos (GOULSON *et al.*, 2015) e, neste contexto, esse estudo possibilitou observar como estressores podem atuar em conjunto na saúde das abelhas.

## 2.5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a exposição larval aos agrotóxicos tornou os adultos subsequentes mais susceptíveis às ações do patógeno *N. ceranae*, aumentando efeitos deletérios no intestino médio causado pela infecção. O inseticida foi responsável pelo aumento da taxa de infecção nos indivíduos expostos somente a esse xenobiótico e nos indivíduos co-expostos. O fungicida não aumentou a taxa de infecção, mas acelerou a maturação dos esporos de *Nosema*. A co-exposição aos agrotóxicos reduziu os efeitos celulares no epitélio intestinal das abelhas comparada aos agrotóxicos isolados, porém favoreceu a infecção ao patógeno. Portanto, doses subletais desses agrotóxicos não causam um dano imediato quando em contato com larvas de abelhas, mas levam à redução da saúde do indivíduo adulto, podendo contribuir para o enfraquecimento das operárias e, progressivamente, ao enfraquecimento da colônia. Os resultados corroboraram com a hipótese inicial, a combinação de dois agrotóxicos na fase larval acarretou em alterações celulares no intestino

médio que alteraram a taxa de infecção e os efeitos do patógeno natural *N. ceranae* durante a fase adulta.

## REFERÊNCIAS

ALAUX, C. *et al.* Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 774–782, 2010.

ALKASSAB, A. T.; KIRCHNER, W. H. Assessment of acute sublethal effects of clothianidin on motor function of honeybee workers using video-tracking analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 200–205, 2018.

ARTZ, D. R.; PITTS-SINGER, T. L. Effects of Fungicide and Adjuvant Sprays on Nesting Behavior in Two Managed Solitary Bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, e0135688, ago. 2015.

BABENDREIER, D. *et al.* Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, v. 35, n. 3, p. 293–300, maio 2004.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A. *et al.* Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 82, p. 22–31, ago. 2012.

BALBA, H. Review of strobilurin fungicide chemicals. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 4, p. 441–451, maio 2007.

BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 51–58, ago. 2015.

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

BÖHME, F. *et al.* Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. **Apidologie**, v. 48, n. 3, p. 353–363, 2017.

BORTOLOTTI, L. *et al.* Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 63–67, 2003.

BRANDT, A. *et al.* The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 40–47, 2016.

CAMPBELL, J. B. *et al.* The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 11–16, 2016.

CARNEIRO, L. S. *et al.* The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. November, p. 109991, 2020.

CARNEIRO, L. T. *et al.* Monitoramento da presença e ausência de *Nosema* em ninhos naturais de *Apis mellifera* em uma área urbana na cidade de Sorocaba: Parque Municipal da Biquinha. **67ª Reunião Anual da SBPC**, v. 67, 2015.

CHEN, Y. P. *et al.* Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 142–147, 2009.

CODLING, G. *et al.* Neonicotinoid insecticides in pollen, honey and adult bees in colonies of the European honey bee (*Apis mellifera* L.) in Egypt. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 122–131, mar. 2018.

CRUZ-LADIM, C. **Abelhas: morfologia e funções de sistemas**. 1. ed. São Paulo: UNESP, 2009.

CRUZ-LADIM, C.; SERRÃO, J. E.; SILVA-MORAES, R. L. M. Cytoplasmic protusions from digestive cells of bees. **Cytobios**, p. 95–104, 1996.

DECOURTYE, A.; DEVILLERS, J. Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 683, p. 85–95, 2010.

DEGRANDI-HOFFMAN, G. *et al.* Effects of Oral Exposure to Fungicides on Honey Bee Nutrition and Virus Levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518–2528, dez. 2015.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y. **Nutrition, immunity and viral infections in honey bees** *Current Opinion in Insect Science* Elsevier Inc., 14 jun. 2015.

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

DOUBLET, V. *et al.* Bees under stress: sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 969–983, abr. 2015.

DUSSAUBAT, C. *et al.* Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, maio 2012.

DUSSAUBAT, C. *et al.* Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31430, nov. 2016.

EIRI, D. M. *et al.* *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2015.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EVEN, N.; DEVAUD, J. M.; BARRON, A. B. **General stress responses in the honey bee** *Insects*, 2012.



FENG, Y. *et al.* Mid-Infrared Spectroscopy Study of Effects of Neonicotinoids on Forager Honey Bee (*Apis mellifera*) Fat Bodies and Their Connection to Colony Collapse Disorder. **bioRxiv**, e205112, 18 out. 2017.

FERNANDES, K. M. *et al.* Quantitative analysis of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 56, p. 490–505, 2010.

FORSGREN, E.; FRIES, I. Comparative virulence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in individual European honey bees. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 212–217, jun. 2010.

FRIES, I. Infectivity and multiplication of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of the honey bee. **Apidologie**, v. 19, n. 3, p. 319–328, 1988.

FRIES, I. *et al.* *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). v. 365, p. 356–365, 1996.

FRIES, I. *et al.* Standard methods for *Nosema* research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1–28, 2 jan. 2013.

FRIOL, P. S. *et al.* Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56–66, out. 2017.

GAGE, S. L. *et al.* *Nosema ceranae* parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb161489, fev. 2018.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 3, p. 493–501, 1992.

GISDER, S. *et al.* Five-year cohort study of *Nosema spp.* in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 3032–3038, maio 2010.

GONÇALVES, W. G. *et al.* Post-embryonic changes in the hindgut of honeybee *Apis mellifera* workers: Morphology, cuticle deposition, apoptosis, and cell proliferation. **Developmental Biology**, v. 431, n. 2, p. 194–204, 2017.

GOULSON, D. REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 977–987, ago. 2013.

GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

GRASSL, J. *et al.* Synergistic effects of pathogen and pesticide exposure on honey bee (*Apis mellifera*) survival and immunity. **Journal of Invertebrate Pathology**, 6 out. 2018.

GREGORC, A. *et al.* Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. **Chemosphere**, v. 147, p. 328–336, mar. 2016.

GREGORC, A.; ELLIS, J. D. Cell death localization in situ in laboratory reared honey bee (*Apis mellifera* L.) larvae treated with pesticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 2, p. 200–207, fev. 2011.

GRELLA, T. C. *et al.* Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. **Chemosphere**, v. 236, e124255, dez. 2019.

GYÖRI, J. *et al.* Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. **Acta Biologica Hungarica**, v. 68, n. 4, p. 345–357, 2017.

HIGES, M. *et al.* Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, n. 3, p. 211–217, 2007.

HIGES, M. *et al.* How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2659–2669, 2008.

HIGES, M. *et al.* Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 4, p. 530–536, 2013.

HLINA, B. L. *et al.* In Preparation. Changes in the sensitivity of piscicide in an invasive species. **Environmental Science & Technology**, 2018.

KIM, Y. H. *et al.* Molecular and Kinetic Properties of Two Acetylcholinesterases from the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 7 nov. 2012.

KURZE, C. *et al.* *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–9, 2015.

KURZE, C. *et al.* Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 154, p. 1–4, maio 2018.

MAIOLINO, P. *et al.* Histopathological findings of the midgut in European honey bee (*Apis mellifera* L.) naturally infected by *Nosema* spp. **Veterinary Medicine and Animal Sciences**, v. 2, n. 1, p. 4, 2014.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2554–2557, 2009.

MCMANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, p. 158–202, 1946.

MOGREN, C. L.; LUNDGREN, J. G. Neonicotinoid-contaminated pollinator strips adjacent to cropland reduce honey bee nutritional status. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–10, 2016.

MORAIS, M. M. *et al.* Protein levels and colony development of Africanized and European honey bees fed natural and artificial diets. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6915–6922, 2013.

- MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The **hnp** Package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, p. 1–23, 13 nov. 2017.
- MULLIN, C. A. *et al.* High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.
- NICHOLLS, E. *et al.* Larval exposure to field-realistic concentrations of clothianidin has no effect on development rate, over-winter survival or adult metabolic rate in a solitary bee, *Osmia bicornis*. **PeerJ**, v. 5, p. e3417, 2017.
- ODEMER, R. *et al.* Sublethal effects of clothianidin and *Nosema* spp. on the longevity and foraging activity of free flying honey bees. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 5, p. 527–538, 19 jul. 2018.
- OECD. Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Repeated Exposure. **OECD Environment, Health and Safety Publications**, 2016.
- OLIVEIRA, C. R. *et al.* Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. **Chemosphere**, v. 236, p. 124282, dez. 2019.
- OLIVEIRA, R. A. *et al.* Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 1122–1133, 1 out. 2014.
- PANEK, J. *et al.* Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 27 set. 2018.
- PEARSE, A. G. E. **Histochemistry theoretical and applied**. Jet. Churc ed. London: July 1, 1954.
- PENG, Y.-C.; YANG, E.-C. Sublethal Dosage of Imidacloprid Reduces the Microglomerular Density of Honey Bee Mushroom Bodies. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19298, 13 maio 2016.
- PETTIS, J. S. *et al.* Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. **Die Naturwissenschaften**, v. 99, n. 2, p. 153–8, fev. 2012.
- PETTIS, J. S. *et al.* Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70182, jul. 2013.
- POQUET, Y.; VIDAU, C.; ALAUX, C. Modulation of pesticide response in honeybees. **Apidologie**, v. 47, n. 3, p. 412–426, maio 2016.
- PRISCO, G. *et al.* Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18466–18471, 2013.
- RAIMETS, R. *et al.* Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. **Chemosphere**, v. 238, jan. 2020.

RETSCHNIG, G. *et al.* Effects, but no interactions, of ubiquitous pesticide and parasite stressors on honey bee (*Apis mellifera*) lifespan and behaviour in a colony environment. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4322–4331, nov. 2015.

ROSA, A. DE S. *et al.* Consumption of the neonicotinoid thiamethoxam during the larval stage affects the survival and development of the stingless bee, *Scaptotrigona aff. depilis*. **Apidologie**, v. 47, n. 6, p. 729–738, 2016.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BELZUNCES, L.; BONMATIN, J.-M. Lethal and sublethal effects, and incomplete clearance of ingested imidacloprid in honey bees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, v. 26, n. 9, p. 1199–1206, nov. 2017.

SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, L. *et al.* Residues of neonicotinoids and their metabolites in honey and pollen from sunflower and maize seed dressing crops. **Journal of Chromatography A**, v. 1428, p. 220–227, jan. 2016.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. *et al.* Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. Spain: Formatex R ed. Badajoz, 2012. p. 696–703.

SIMON-DELISO, N. *et al.* Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–16, 2014.

SIMON-DELISO, N. *et al.* Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34, 2015.

SMITH, M. L. The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e43319, 16 ago. 2012.

SOUZA, M. S. *et al.* Frequência de esporos de *Nosema* spp. em ninhos naturais de *Apis mellifera* localizados em área de cultura perene. In: **Anais da 67ª Reunião Anual da SBPC**. SBPC ed. São Carlos: 2015. p. 67.

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 9, e3277, 2019.

TARNO, H.; WICAKSONO, K. P.; BEGLIOMINI, E. Floral Stimulation and Behavior of Insect Pollinators Affected by Pyraclostrobin on Arabica Coffee. **AGRIVITA Journal of Agricultural Science**, 2018.

TAVARES, D. A. *et al.* In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370–378, set. 2015.

TAVARES, D. A. *et al.* Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 386–393, 2017.

TAVARES, D. A. *et al.* Exposure to thiamethoxam during the larval phase affects synapsin levels in the brain of the honey bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, n. April 2018, p. 523–528, 2019.

THANY, S. H. *et al.* Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor alpha3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. **Insect molecular biology**, v. 12, n. 3, p. 255–62, jun. 2003.

THERNEAU, T. M. **A Package for Survival Analysis in S**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=survival>>.

THERNEAU, T. M.; GRAMBSCH, P. M. **Modeling Survival Data: Extending the Cox Model**. Springer ed. New York: 2000, p. 356.

TONG, Z. *et al.* A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in China. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 1578–1586, nov. 2018.

TOSI, S. *et al.* A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides. **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 208–218, fev. 2018.

TRAVER, B. E.; FELL, R. D. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 408–410, jul. 2012.

VIDAU, C. *et al.* Differential proteomic analysis of midguts from *Nosema ceranae*-infected honeybees reveals manipulation of key host functions. **Journal of invertebrate pathology**, v. 121, p. 89–96, set. 2014.

WESSLER, I. *et al.* Honeybees Produce Millimolar Concentrations of Non-Neuronal Acetylcholine for Breeding: Possible Adverse Effects of Neonicotinoids. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, e0156886, jun. 2016.

WILLIAMSON, S. M.; WILLIS, S. J.; WRIGHT, G. A. Exposure to neonicotinoids influences the motor function of adult worker honeybees. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 8, p. 1409–1418, out. 2014.

YANG, E. C. *et al.* Impaired Olfactory Associative Behavior of Honeybee Workers Due to Contamination of Imidacloprid in the Larval Stage. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. D. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

### 3 ARTIGO 2

#### **Efeito silencioso da exposição larval ao fungicida piraclostrobina no organismo não-alvo *Apis mellifera* africanizada e sua interação com o patógeno *Nosema ceranae* na fase adulta**

Silent effect of larval exposure to the fungicide pyraclostrobin in the non-target organism *Apis mellifera* africanized and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood

#### Resumo

As abelhas possuem contato diariamente com uma ampla variedade de fungicidas, os quais vem sendo associado como um fator estressor para esses organismos. Além do princípio ativo, ingredientes considerados inertes presentes nas formulações comerciais desses agrotóxicos também entram em contato com as abelhas, inclusive na fase larval. Objetivou-se comparar os efeitos da exposição larval ao fungicida piraclostrobina (princípio ativo-i.a. e formulação comercial-f.c.) na sobrevivência e no intestino médio de abelhas adultas inoculadas com esporos de *Nosema ceranae* por meio de biomarcadores celulares de citotoxicidade e estresse celular. Em condições *in vitro* larvas de *A. mellifera* receberam dieta artificial contendo 2% da solução teste do terceiro ao sexto dia de alimentação. Após um dia da emergência das operárias, estas receberam oralmente 2 µL de solução açucarada contendo 100.000 esporos de *N. ceranae* infectantes. A exposição larval ao fungicida (i.a. e f.c.) não afetou o desenvolvimento pós-embrionário nem a sobrevivência das abelhas adultas, contudo induziram citotoxicidade nas células do intestino médio, evidenciada pelo aumento da fragmentação de DNA e alteração no padrão de imunomarcção de HSP70. O patógeno *Nosema* aumentou os danos no epitélio intestinal das abelhas adultas. Na ausência do patógeno, os efeitos citotóxicos do fungicida f.c. foram menos intensos do que aos observados pela exposição do i.a., bem como reduziu a imunomarcção de HSP70, porém na presença do patógeno os efeitos do fungicida foram potencializados. Portanto, baixas doses de fungicidas presentes no *bee bread* (alimento larval) podem afetar a saúde e comprometer funções fisiológicas das abelhas adultas.

Palavras-chave: Agrotóxico. Intestino médio. Estrobilurina. Não-alvo.

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Diversas classes de agrotóxicos, como inseticidas, fungicidas, acaricidas e herbicidas, são aplicadas juntas ou com espaçamento temporal em uma mesma cultura agrícola, muitos deles são persistentes no meio ambiente e possuem ação sistêmica, acumulando-se na planta e atingindo recursos florais como o pólen, néctar e óleos vegetais (CULLEN *et al.*, 2019; THOMPSON *et al.*, 2014). Esta diversidade de resíduos de agrotóxicos pode atingir organismos não-alvos, principalmente visitantes florais e polinizadores. Dentre os polinizadores, destacam-

se as abelhas, responsáveis pela polinização de mais de um terço das culturas agrícolas (SPIVAK *et al.*, 2011).

Amplamente utilizados para produção agrícola (CULLEN *et al.*, 2019), os fungicidas estão entre os resíduos de agrotóxicos mais detectados em matrizes apícolas e recursos florais (LONG; KRUPKE, 2016; RAIMETS *et al.*, 2020). Fungicidas estrobilurina foram encontrados no pólen, néctar, mel, cera, *bee bread* (alimento larval) e também no corpo de abelhas, e em alguns apiários, seus resíduos ultrapassam a margem de 100 ppb (JOHNSON *et al.*, 2010; OSTIGUY *et al.*, 2019). Especificamente, o estrobilurina piraclostrobina foi encontrado no pólen corbicular com valores máximos de 145,8 ppb (MULLIN *et al.*, 2010), 124 ppb (TOSI *et al.*, 2018) e 27.000 ppb (PETTIS *et al.*, 2013); no *bee bread* em concentrações de 0,48 ppb, 8,17 ppb (BEYER *et al.*, 2018) e 2.170 ppb (YODER *et al.*, 2013).

Entretanto, não somente o princípio ativo dos agrotóxicos pode permanecer nas plantas, como também compostos inertes presentes nas formulações comerciais. Surfactantes foram encontrados em 60% das amostras de pólen no estudo de Chen e Mullin (2013). Além disso, Mullin (2015) mostrou que os ingredientes inertes presentes nas formulações de alguns agrotóxicos podem apresentar toxicidade maior que o princípio ativo quando em contato com as abelhas, sendo que nos fungicidas esta toxicidade pode aumentar em até 26.000 vezes (MULLIN *et al.*, 2016). Segundo Simon-Delso *et al.* (2014) o número de resíduos de fungicidas é um dos principais fatores estressores para as colônias, a probabilidade da ocorrência de distúrbios de colônias aumenta quando há resíduos de dois ou mais fungicidas.

Fungicidas já foram relacionados com alterações comportamentais em abelhas (ARTZ; PITTS-SINGER, 2015; TADEI *et al.*, 2019), redução na longevidade de abelhas adultas (FISHER *et al.*, 2017), alterações celulares e da microbiota intestinal (ANDERSON *et al.*, 2011; CARNEIRO *et al.*, 2020; DEGRANDI-HOFFMAN *et al.*, 2017) e alterações no sistema imunológico (CIZELJ *et al.*, 2016), podendo facilitar infecções por patógenos. No estudo de Pettis *et al.* (2013) os fungicidas piraclostrobina e clorotalonil aumentaram a susceptibilidade à infecção intestinal por esporos de *Nosema ceranae*. Contudo, ainda existem poucos estudos sobre os efeitos combinados de fungicidas ao patógeno *Nosema ceranae*.

O mecanismo de ação dos fungicidas estrobilurina consiste na inibição da quinona oxidase do citocromo b na mitocôndria de fungos, interrompendo a síntese de ATP (BALBA, 2007; BARTLETT *et al.*, 2002). Em abelhas o mecanismo de ação não é conhecido, porém evidências sugerem que o fungicida pode interferir negativamente na função mitocondrial desses organismos (CAMPBELL *et al.*, 2016; DEGRANDI-HOFFMAN *et al.*, 2015). Parasitas intracelulares do intestino de abelhas, como *Nosema ceranae*, também podem interferir

negativamente na saúde das abelhas, pois representa um fator estressor as células intestinais, levando a estresse energético no indivíduo (KURZE *et al.*, 2016; MAYACK; NAUG, 2009) e lise celular no final do ciclo do patógeno para liberação dos esporos (FRIES *et al.*, 1996). Entretanto, quando um organismo é exposto a fatores estressores, mecanismo de defesa celular são ativados, dentre eles a expressão de proteínas de choque térmico, como por exemplo a HSP70 dependente de ATP para a sua atividade de chaperona (BEERE, 2004; KING; MACRAE, 2015). A expressão dessas proteínas é considerada um biomarcador de exposição aos xenobióticos prevenindo a morte celular (SILVA-ZACARIN; GREGORC; MORAES, 2006) e, portanto, HSP70 é utilizada para mensurar níveis de estresse celular (KIM *et al.*, 2019).

Este trabalho teve como objetivo comparar os efeitos da exposição larval ao princípio ativo e formulação comercial do fungicida piraclostrobina e avaliar as influências dessa exposição na infecção por *N. ceranae* no intestino médio das abelhas na fase adulta por meio de biomarcadores celulares de citotoxicidade e resposta ao estresse.

## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1 Exposição aos agrotóxicos

Foram conduzidos três bioensaios larvais de exposição crônica, cada um com N=144 larvas por grupo experimental, seguindo a metodologia descrita pela OECD nº 239 (OECD, 2016). Os bioensaios ocorreram no verão e dois na primavera de 2019.

Larvas de primeiro instar de três colônias saudáveis de *Apis mellifera* africanizada foram transferidas para placas de 48 poços contendo cúpulas com 20 µL de dieta artificial (AUPINEL *et al.*, 2005) e mantidas em uma caixa hermética a 34°C e umidade de 95%. No terceiro ao sexto dia do bioensaio as larvas receberam a dieta artificial contendo a solução teste. Cada placa continha todos os grupos experimentais: controle - CTL, controle solvente (acetona, concentração inferior a 2%) - ACT, fungicida piraclostrobina (princípio ativo) – FUNG P.A. e fungicida piraclostrobina na formulação comercial Comet® - FUNG. COM.

A concentração do fungicida foi baseada em concentrações detectadas no pólen de 146 ppb (MULLIN *et al.*, 2010; TOSI *et al.*, 2018) e no total de pólen consumido na fase larval (BABENDREIER *et al.*, 2004); desse modo, a concentração de piraclostrobina (princípio ativo e formulação comercial) na dieta consumida no período larval foi de 4,93 ppb (*intake* = 0,69 ng/larva). Concomitantemente foi realizado o teste com o dimetoato (inseticida padrão, *intake* = 7420 ng/larva) para validação do teste segundo a OECD nº 239 (OECD, 2016).



Após um dia da emergência dessas abelhas, os indivíduos de cada grupo experimental foram divididos em outros dois grupos, um dos grupos recebeu oralmente 2  $\mu$ L de solução açucarada contendo 100.000 esporos frescos de *N. ceranae* extraídos de abelhas forrageiras por maceração do abdômen (EIRI *et al.*, 2015; FRIES *et al.*, 2013) e o outro grupo recebeu 2  $\mu$ L de solução açucarada sem esporos. As abelhas foram mantidas em estufa B.O.D a 34°C e 70% de umidade dentro de potes com orifícios para promover a ventilação contendo dois alimentadores cada, um com solução açucarada 50% m/m e outro com uma dieta líquida proteica contendo 17% de extrato de levedura, 2% de mistura de aminoácidos para animais (AMINOMIX®) e 81% de solução aquosa de sacarose 50% m/m (adaptada de MORAIS *et al.*, 2013). Adicionalmente, três potes sem abelhas foram acrescentados para o controle da evaporação do alimento. Todos os alimentadores foram pesados diariamente para cálculo da taxa de alimentação.

### 3.2.2 Análise histopatológica

Após seis dias da inoculação com esporos de *Nosema*, seis indivíduos de cada grupo experimental foram removidos dos potes e anestesiados a 4°C para dissecação do intestino médio. Os órgãos foram fixados em paraformaldeído 4% em tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,4 por 24 horas a 4°C. Após a fixação, foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1M e desidratados lentamente a partir de trocas em soluções de etanol com concentração crescente (15, 30, 50, 70 – “overnight”, 85, 90, 95 e 100%) à baixa temperatura (4°C) (SILVA-ZACARIN *et al.*, 2012). Três órgãos por grupo experimental foram embebidos em historesina líquida Leica® (10°C) e, em seguida, emblocados em historesina de inclusão (historesina de embebição acrescida de catalisador na proporção 15mL:1mL). Após a polimerização, os blocos de resina foram submetidos a microtomia para obter secções histológicas dos órgãos com 3 $\mu$ m de espessura. Por indivíduo foram produzidas seis lâminas com 12 secções cada.

Os outros três órgãos de cada grupo experimental, após a desidratação, foram diafanizados em xilol e embebidos em parafina líquida ultrapura seguida de inclusão em parafina ultrapura (Paraplast). Os blocos de parafina foram submetidos a microtomia para obter secções histológicas dos órgãos com 8  $\mu$ m de espessura. As lâminas foram avaliadas por métodos de imunofluorescência (tópico 3.2.3).

As análises histológicas foram realizadas a partir de lâminas coradas com Hematoxilina-eosina (1%) (ANEXO 1) para análise morfológica do intestino e Azul de toluidina (1%, pH  $\approx$ 10, ANEXO 2) para detecção de células infectadas com esporos de *Nosema* (FRIES *et al.*, 2013). Realizou-se a caracterização semi-quantitativa de alterações do intestino médio de três

indivíduos por grupo experimental, conforme descrito no tópico 2.2.4, definiu-se 14 parâmetros histológicos para determinação de danos no intestino médio (Tabela 4). As alterações foram classificadas em quatro níveis de intensidade: 0 – ausência de alteração, 1 – alteração sutil, 2 – alteração moderada, 3 – alteração intensa e em três níveis de importância patológica: 1 – mínima importância patológica (danos reversíveis), 2 – moderada importância patológica (danos geralmente reversíveis); 3 – severa importância patológica (danos irreversíveis) (BERNET *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2019), a fim de calcular o índice de lesão ( $I_{le}$ ) de cada alteração e o índice total de lesão do órgão ( $I_{org}$ ) a partir da somatória dos índices de lesão (BERNET *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Idem equação 4 e 5 no tópico 2.2.4.

Para medir a espessura do epitélio ventricular e a taxa celular de infecção com esporos de *Nosema*, foram analisados três indivíduos de cada grupo e cinco secções histológicas de cada indivíduo. Cada secção histológica do intestino médio foi dividida em três regiões: anterior (próxima à válvula cardíaca), central e região posterior (próximo ao início do reto). Em cada região do intestino foram analisados quatro diferentes campos de visão, totalizando 12 áreas por secção. Para o cálculo do escore referente a redução da espessura do epitélio, os níveis de intensidade 0, 1, 2 e 3 foram atribuídos respectivamente aos seguintes intervalos:  $>50 \mu\text{m}$ , 41-50  $\mu\text{m}$ , 35-40  $\mu\text{m}$ ,  $<35 \mu\text{m}$ . Para o escore referente a infecção por *Nosema*, os níveis de intensidades do escore foram atribuídos conforme a porcentagem de células infectadas: 0 – 0% de infecção, 1 – menor que 30% de infecção, 2 – entre 30 e 65% de infecção e, 3 – maior que 65% de infecção.

### 3.2.3 Análise de biomarcadores celulares por imunofluorescência

Lâminas sinalizadas contendo 12 secções histológicas cada foram desparafinizadas com xilol e reidratadas em cascata decrescente de álcool. Em seguida, estas foram submetidas à recuperação antigênica com tampão citrato de sódio 0,1M (pH 6) por 1 minuto e 30 segundos no micro-ondas em potência alta. Após a recuperação antigênica e permeabilização com citrato, as lâminas foram cobertas em tampão PBS e mantidas em câmara úmida até a próxima etapa.

#### 3.2.3.1 Reação de TUNEL para imunomarcção de fragmentação de DNA

Utilizou-se o Kit de Detecção de Morte de Células In Situ (ISCCDK – “In-Situ Cell Death Detection Kit”, Roche®) para reação de tunel.

Em uma câmara úmida e escura, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de solução enzimática com fluoróforo conjugado em cada lâmina para ocorrer a reação de TUNEL (“Terminal

deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling”), segundo método de Gavrieli, Sherman e Ben-sasson (1992), a fim de identificar regiões de quebras de DNA de fita simples e dupla, indicativas de início de morte celular.

Após a incubação das lâminas com a solução de reação de Tunel por uma hora a 37°C, estas foram lavadas em tampão PBS. Utilizou-se meio de montagem com DAPI (350/455 nm, faixa de excitação/emissão) para montagem das lâminas.

As lâminas foram analisadas no microscópio confocal de varredura a laser utilizando laser 488 nm na faixa de leitura de 480 a 576 nm, correspondente à faixa de excitação e emissão da fluoresceína (identificação dos núcleos com quebras no DNA). Os padrões utilizados para a marcação da reação de túnel foram intensidade do laser cinco, ganho 1034,8 V e *offset* -30%. Três secções histológicas de cada grupo experimental foram observadas para análise qualitativa da presença ou ausência de células com marcação positiva para fragmentação do DNA no epitélio ventricular.

### 3.2.3.2 Detecção de HSP70 por imunofluorescência

Após a recuperação antigênica, lâminas contendo cortes histológicos de três indivíduos por grupo experimental, foram imersas em solução de Triton 0,05% no tampão citrato de sódio 0,1M por 10 minutos, em seguida lavadas em tampão PBS. Em uma câmara úmida, as lâminas foram cobertas por 15 minutos com solução contendo 3% de soro normal de camundongo para o bloqueio de reações inespecíficas do anticorpo primário.

Preparou-se uma solução de anticorpo primário (Anti-HSP70, produzido em camundongo) na concentração 1:300, a qual foi colocada sob as lâminas e mantido *overnight* a 4°C. Em uma lâmina extra não foi adicionado o anticorpo primário como controle negativo da reação. Em seguida, a câmara úmida foi transferida para banho-maria a 37°C por uma hora. Ao final da incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com tampão PBS e foi realizado o bloqueio de reações inespecíficos para o anticorpo secundário com uma solução de BSA à 3% por 30 minutos.

A incubação com o anticorpo secundário (IgG de coelho, anti-camundongo, conjugado com Alexa 594) foi realizada no escuro na concentração 1:100. As lâminas foram cobertas com 100µL da solução contendo o anticorpo secundário por uma hora a 37°C. Em uma lâmina extra não foi adicionado o anticorpo secundário como controle negativo da reação. Após a incubação e lavagem com tampão PBS, as lâminas foram contadas com meio de montagem contendo DAPI para análise no microscópio confocal de varredura a laser.

Os padrões utilizados nas análises da imunomarcagem de HSP70 foram laser 552 nm, com nível de intensidade cinco, ganho de 800V, *offset* -20% e faixa de excitação/emissão de 566 a 671 nm, respectivamente. Para marcação com DAPI utilizou-se o laser 405 nm, nível de intensidade 1, ganho 960 V, *offset* -50% e faixa de excitação/emissão 381 a 502 nm respectivamente. Para cada indivíduo foram analisadas três secções histológicas, sendo feitas duas reconstruções resultantes da varredura em Z na região mediana do intestino médio com total de 6  $\mu\text{m}$  de espessura, na qual continham 13 leituras (frames) de 0,5  $\mu\text{m}$  de intervalo entre elas, totalizando seis reconstruções 3D por indivíduo.

A quantificação da intensidade de marcação específica foi realizada pela amostragem de cinco regiões aleatórias (ROI) com área igual a 1.256,64  $\mu\text{m}^2$  cada, distribuídos no epitélio do intestino médio de cada reconstrução 3D (N = 90 ROIs/grupo experimental). Cada ROI foi posicionado em regiões do epitélio sem traqueias e sem lúmen, cobrindo toda espessura das células digestivas. O nível de intensidade média entre os 13 frames de cada reconstrução 3D e a intensidade máxima de marcação na reconstrução, medida pela sobreposição dos frames em resolução máxima, foram quantificados pelo software LAS X 3.5.5. Os resultados foram analisados por modelo linear generalizado (GLM) com distribuição quasipoisson, no modelo considerou-se indivíduos e secção histológica como fatores de variância entres os grupos experimentais.

### 3.2.4 Análise dos dados

Todos os resultados foram analisados a partir do programa R (versão 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, AT, 2019). Para cada conjunto de dados foram verificados a normalidade e homogeneidade a partir dos testes de Shapiro-wilk e Bartlett, respectivamente. Dados paramétricos foram analisados por Anova seguido do pós teste Tukey. Utilizou-se GLM com distribuição binomial e quasibinomial para dados de sobrevivência, e GLM com distribuição quasipoisson para análises morfométricas e da taxa de alimentação, seguido de pós-teste com tukey ajustado. Resultados histológicos foram analisados por meio do teste de Wilcoxon/Kruskal-Wallis, com valor de P ajustado pelo método de Benjamini-Hochberg. Para análise da longevidade de abelhas adultas utilizou-se a regressão de Cox e o pacote “survival” (THERNEAU, 2015; THERNEAU; GRAMBACH, 2000) e o pacote “ecotox” para análise do tempo letal médio (HLINA *et al.*, 2018). O modelo estatístico utilizado para cada conjunto de dado foi estabelecido com base na análise de resíduos realizado pelo Half-normal plot usando o pacote hnp (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). Considerou-se significativos valores com  $P < 0,05$ .

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Exposição aos agrotóxicos

Não houve diferença na mortalidade larval média dos três bioensaios larvais entre os grupos não expostos e os grupos expostos ao fungicida (Tabela 8,  $P = 0,08$ ). Entretanto, o bioensaio realizado no verão diferiu dos realizados na primavera, as larvas expostas ao fungicida comercial apresentaram mortalidade de  $40,97\% \pm 2,08$  ( $P = 0,04$ ). As taxas de pupação e emergência não diferiram entre os grupos experimentais ( $P = 0,41$  e  $0,20$ , respectivamente).

TABELA 8. Taxas médias da mortalidade relativa e das fases de desenvolvimento durante o período pós-embrionário (média  $\pm$  erro padrão). <sup>1</sup>Não há diferença significativa entre os grupos experimentais, letras diferentes representam diferença significativa entre os grupos,  $P$  significativo  $< 0,05$ . CTL – controle, ACT – acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida na formulação comercial.

	Mortalidade larval	Pupação <sup>1</sup>	Emergência <sup>1</sup>
CTL	$14,17 \pm 2,59$ a	$75,19 \pm 2,88$	$65,34 \pm 4,09$
ACT	$13,82 \pm 2,27$ a	$78,91 \pm 2,61$	$66,61 \pm 3,94$
FUNG P.A.	$18,67 \pm 3,67$ a	$76,55 \pm 3,42$	$62,91 \pm 4,55$
FUNG. COM.	$21,36 \pm 3,84$ a	$80,63 \pm 4,11$	$70,22 \pm 3,94$
Dimetoato	$91,67 \pm 1,44$ b	-	-

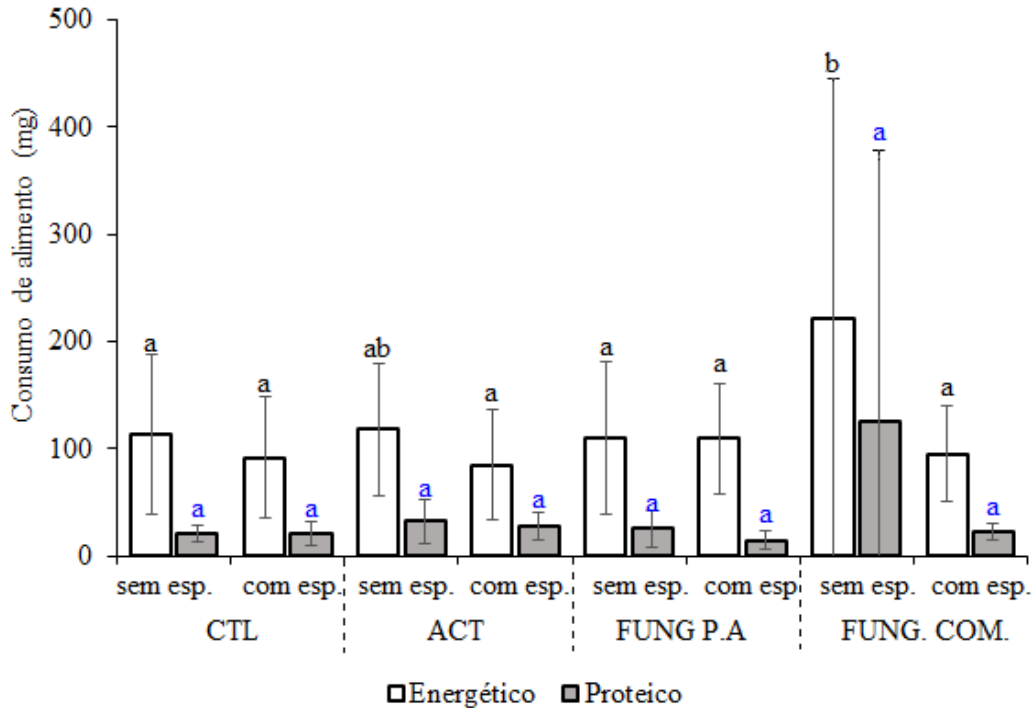
O fungicida isolado ou em combinação com o patógeno *N. ceranae* não afetou a sobrevivência das abelhas adultas (Tabela 9). O patógeno reduziu o tempo letal médio das abelhas do grupo controle, porém essa diferença não foi observada nos grupos expostos.

TABELA 9. Tempo letal médio e probabilidade de sobrevivência de abelhas expostas ao fungicida durante à fase larval. CTL – controle, ACT – acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida na formulação comercial. Esp. *Nosema*: presença ou ausência de inoculação de esporos de *N. ceranae*. TL50 = tempo letal médio; IC = intervalo de confiança; Exp(coef): número de vezes que o grupo experimental possui de morrer comparado ao controle; EP = erro padrão, P = probabilidade de significância em comparação ao grupo referência (CTL, sem esporos).

Grupo experimental	Esp. <i>Nosema</i>	Tempo letal médio			Sobrevivência	
		TL50	IC	$\chi^2$	Exp(coef) $\pm$ EP	P
CTL	Ausente	6,01 a	4,92 - 6,99	22,91	1,00	-
	Presente	3,91 bc	3,18 - 4,45	15,42	1,33 $\pm$ 0,23	0,21
ACT	Ausente	4,95 ac	3,37 - 6,02	39,94	1,31 $\pm$ 0,19	0,15
	Presente	4,06 bc	3,61 - 4,46	19,82	1,48 $\pm$ 0,22	0,07
FUNG. P.A.	Ausente	4,22 ab	2,88 - 5,33	48,75	1,09 $\pm$ 0,19	0,64
	Presente	3,85 ab	2,16 - 4,95	22,77	0,79 $\pm$ 0,24	0,33
FUNG. COM.	Ausente	5,82 a	4,71 - 6,95	46,58	0,81 $\pm$ 0,20	0,30
	Presente	4,81 ab	3,62 - 5,71	12,65	0,79 $\pm$ 0,23	0,30

A infecção com esporos de *Nosema* e a exposição ao fungicida não alteraram a taxa de alimentação (Figura 31), apesar do FUNG. COM. sem esporos ter apresentado uma taxa de alimentação energética maior que do grupo controle, ela não diferiu do grupo controle solvente. A presença de esporos teve uma correlação negativa baixa com a taxa de alimentação ( $\rho = -0,14$ ;  $P = 0,01$ ), assim como a correlação entre idade e a taxa de alimentação ( $\rho = -0,103$ ;  $P = 0,05$ ).

FIGURA 31. Média do consumo diário de alimento energético (solução açucarada) e proteico por indivíduo  $\pm$  desvio padrão, durante seis dias após a inoculação com esporos de *N. ceranae*. Letras diferentes da mesma cor representam diferenças significativas entre os grupos experimentais. CTL – controle, ACT – acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida na formulação comercial. esp. = esporo de *N. ceranae*.

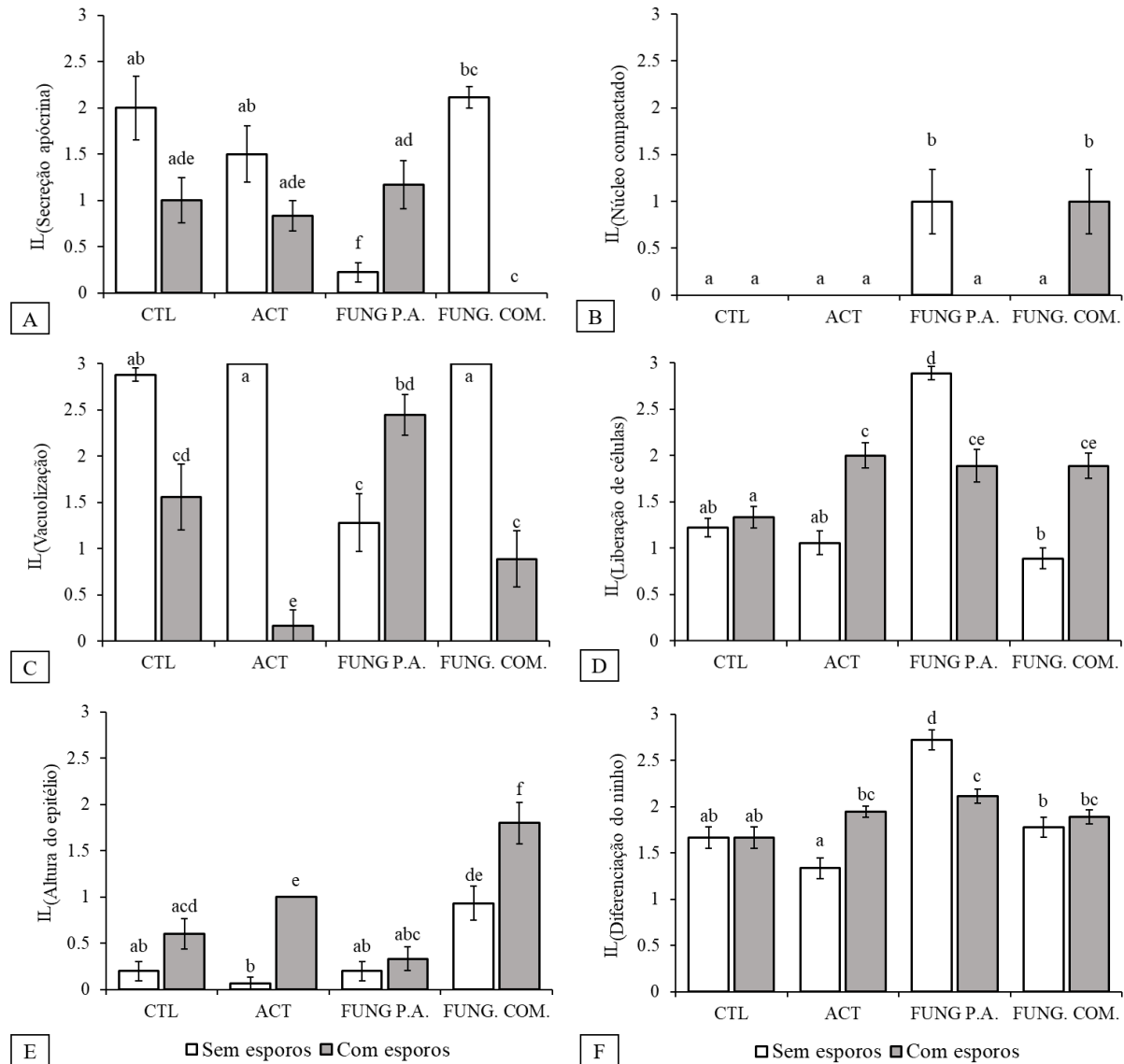


### 3.3.2 Análise histopatológica

O princípio ativo do fungicida, sem esporo, levou à maior frequência de células digestivas com condensação do núcleo (Figura 32B), bem como ao aumento de liberação de células para o lúmen (Figura 32D) e ao aumento de diferenciação das células regenerativas dos ninhos (Figura 32F) com redução na frequência de ninhos (Figura 33C), aumento de vacuolização degenerativa (Figura 33A), redução da frequência de pequenos vacúolos (Figura 32C) e aumento de núcleos picnóticos no epitélio (Figura 33B). Essas alterações, com exceção da liberação de células que não diferiu do grupo controle solvente, só foram observadas na formulação comercial quando em combinação com o patógeno (Figura 34).

A observação de secreção apócrina foi predominante nos grupos controles, com e sem esporo, e no FUNG COM. sem esporo.

FIGURA 32. Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de baixa importância patológica (média  $\pm$  erro padrão). A) Secreção apócrina; B) Núcleo com cromatina compactada; C) Pequenos vacúolos no citoplasma; D) Liberação de células no lúmen; E) Altura do epitélio; F) Diferenciação do ninho de células regenerativas. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida formulação comercial. Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.



Em combinação com o patógeno, o número de núcleos picnóticos no ninho foi maior no FUNG P.A. e FUNG. COM. (Figura 33D). A formulação comercial desse fungicida + esporo, diferentemente do princípio ativo, reduziu a espessura do epitélio, provocou uma desestruturação epitelial do órgão (Figura 34A) e redução na frequência de vilosidades do órgão (Figura 34B e D).



FIGURA 33. Índices de lesão (IL) de alterações morfológicas de importância patológica moderada (média  $\pm$  erro padrão). A) Vacuolização degenerativa; B) Núcleo picnótico no epitélio; C) Redução de ninhos de células regenerativas; D) Núcleo picnótico no ninho de células regenerativas; E) Membrana peritrófica; F) Infecção com esporos de *N. ceranae*. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida formulação comercial. Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

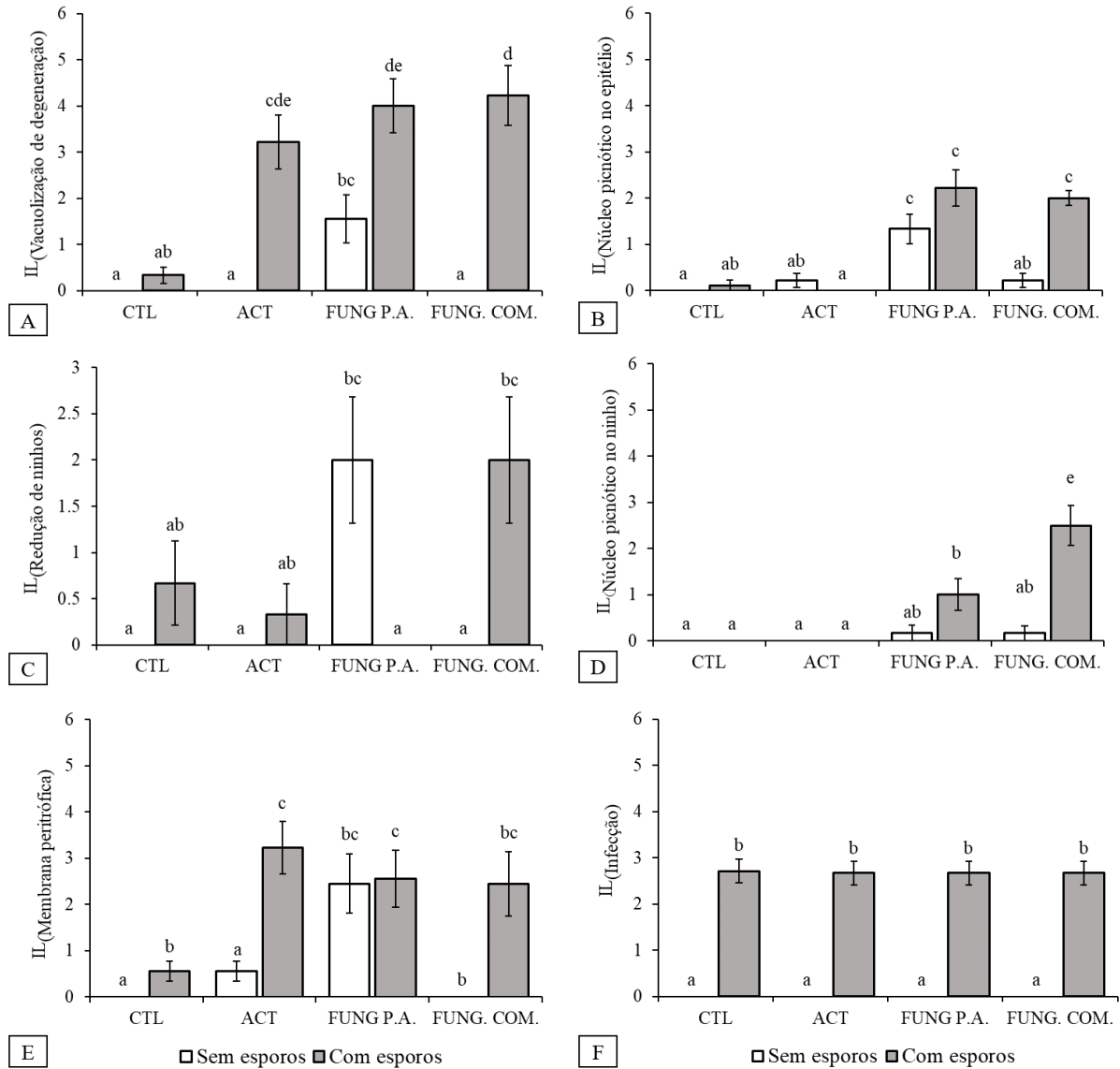
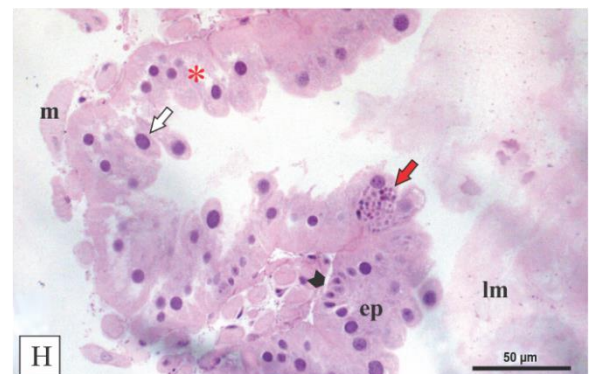
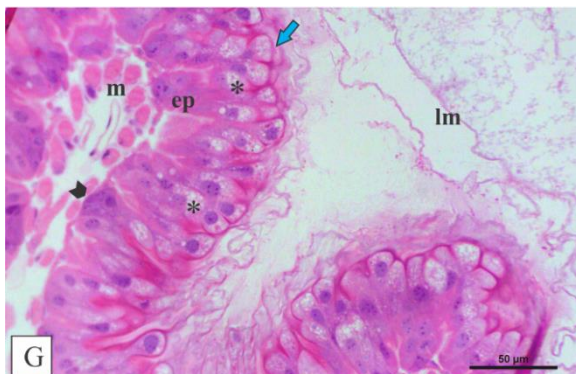
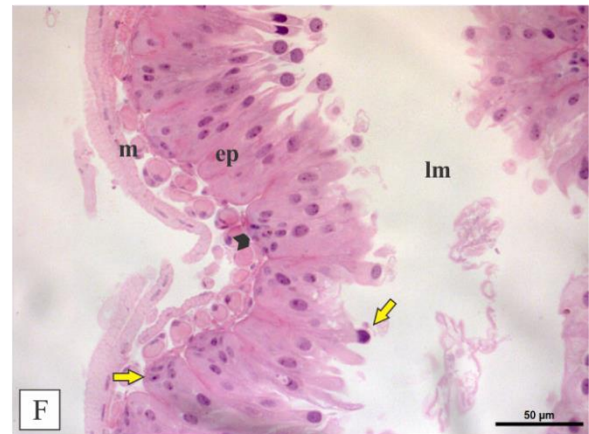
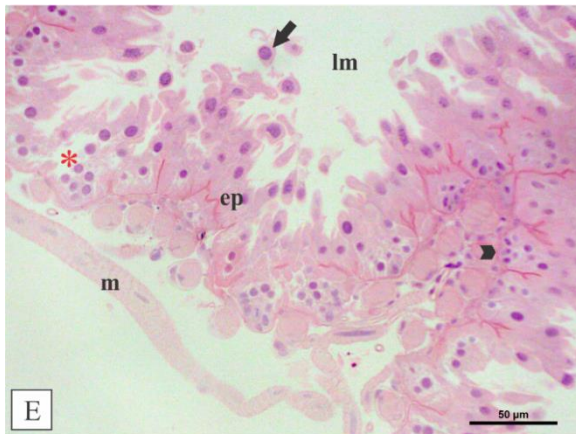
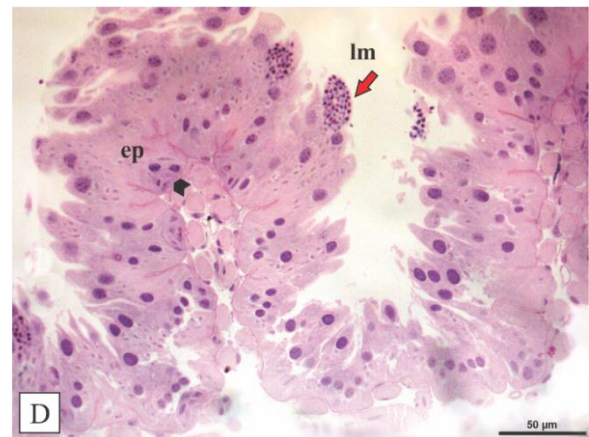
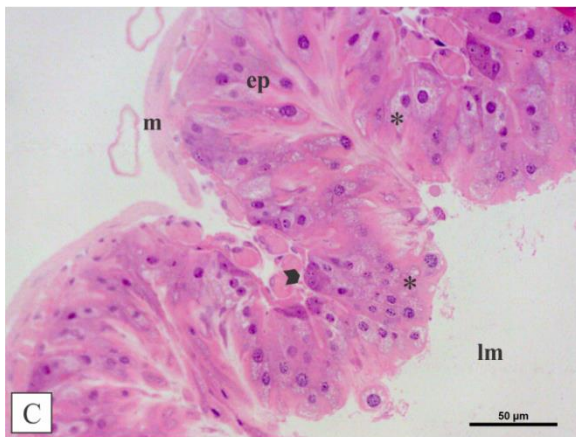
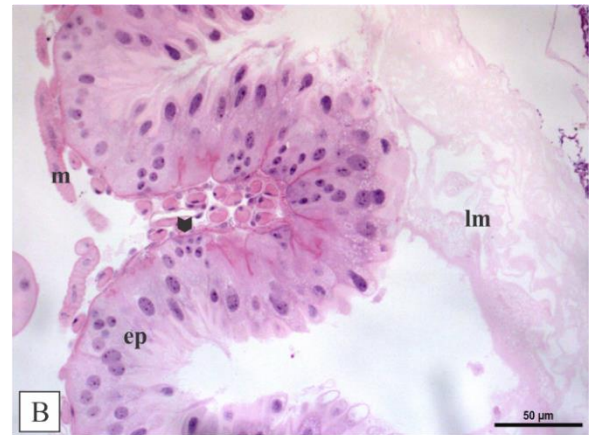
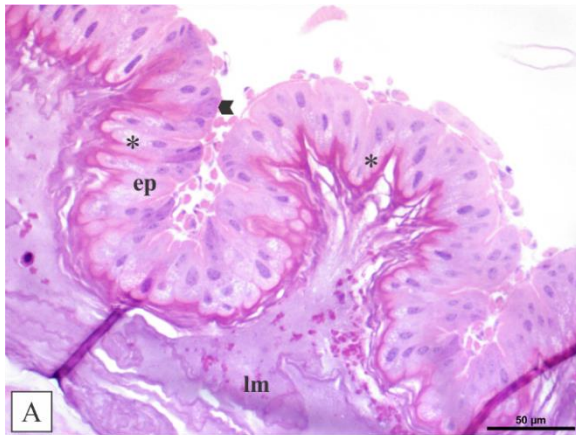


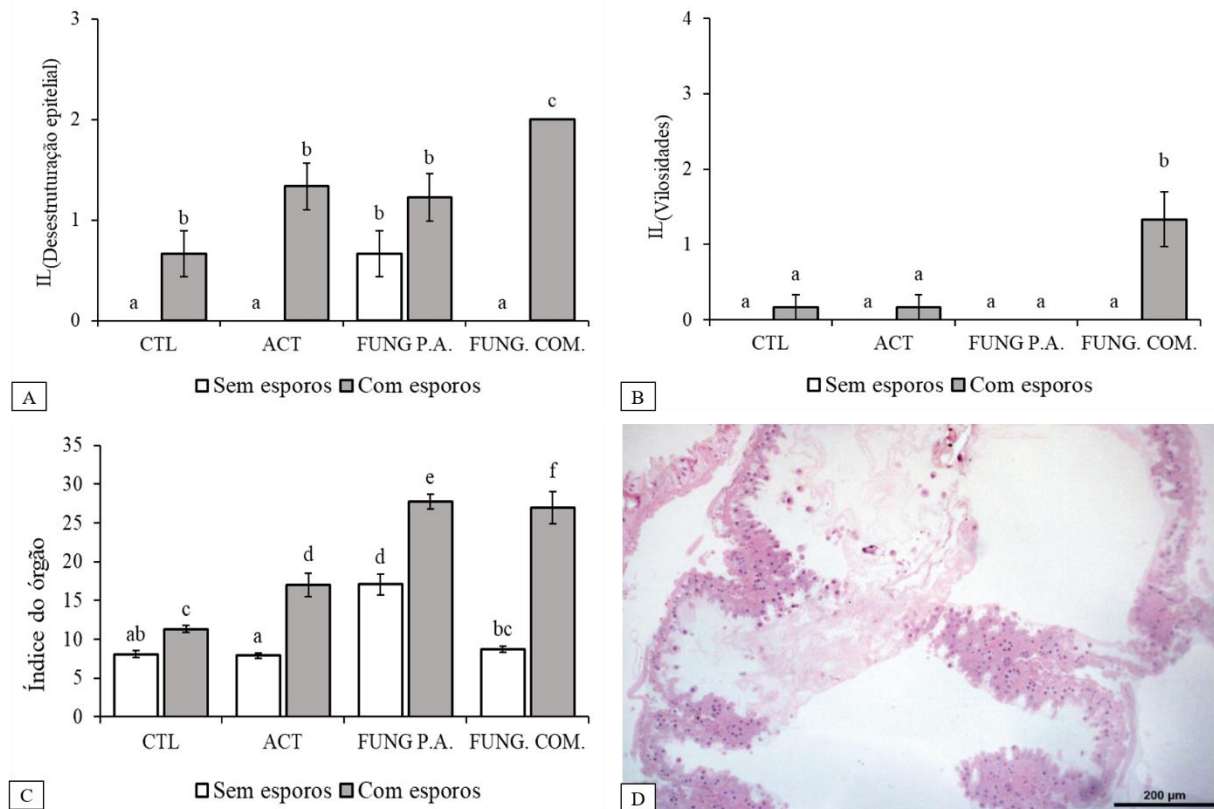
FIGURA 34. Fotomicrografias da histologia do intestino médio de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e ao patógeno *N. ceranae* na fase adulta. A) Controle; B) Controle + esporo; C) Controle solvente; D) Controle solvente + esporo; E) Fungicida princípio ativo; F) Fungicida princípio ativo + esporo; G) Fungicida formulação comercial; H) Fungicida formulação comercial + esporo. ep: epitélio, lm: lúmen, m: músculo, ponta de seta preta: ninhos de células regenerativas; seta preta: liberação de célula para o lúmen; seta amarela: núcleo

picnótico; seta azul: secreção apócrina; seta branca: núcleo com cromatina compactada; seta vermelha: esporos de *N. ceranae*; asterisco preto: vacuolização simples; asterisco vermelho: área com vacuolização degenerativa. Coloração H.E.



O índice total de lesão no órgão ( $I_{org}$ ) foi maior no grupo FUNG P.A. sem esporos, em comparação com o grupo controle (Figura 35C), e em todos os grupos experimentais inoculados com o patógeno, sendo mais pronunciado nos grupos expostos ao fungicida. O FUNG. COM. apresentou  $I_{org}$  maior que os grupos controles apenas na presença do patógeno.

FIGURA 35. Alterações estruturais no epitélio do intestino médio de *A. mellifera* (média  $\pm$  erro padrão). A) Desestruturação epitelial; B) Redução da amplitude e frequência de vilosidades; C) Índice total de lesão no intestino médio; D) Secção do intestino médio com vilosidades esparsas e epitélio com desestruturação. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida formulação comercial. Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.



A partir da morfometria do epitélio observou-se que a inoculação com esporos de *Nosema ceranae* em abelhas não expostas aos agrotóxicos não alterou a espessura do epitélio (Figura 36). O grupo ACT + esporo apresentou uma altura do epitélio maior que os demais grupos ( $P < 0,001$ ).

As abelhas expostas ao fungicida comercial, sem esporos, apresentaram um epitélio intestinal mais fino que os demais grupos quanto a espessura média geral (Figura 36A), especificamente na região anterior do órgão (Figura 36B),  $P < 0,001$ . Com esporo de *Nosema*,

este grupo teve redução da altura do epitélio em todas as regiões do órgão ( $P < 0,001$ ). O princípio ativo do fungicida não afetou a espessura do epitélio ( $P = 0,99$ ).

A taxa de infecção celular média, analisada por meio de seções histológicas do intestino médio, não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 37A). O princípio ativo do fungicida aumentou três vezes mais a taxa de células infectadas com esporos maduros ( $P < 0,001$ ), porém essa diferença não foi observada na infecção total, nem na exposição ao fungicida na formulação comercial ( $P = 0,28$ ).

FIGURA 36. Espessura do epitélio ventricular de *Apis mellifera* (média  $\pm$  erro padrão). A) Média da espessura do órgão; B) Espessura média da região anterior do ventrículo; C) Espessura média da região central do ventrículo; D) Espessura média da região posterior do ventrículo. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida formulação comercial. Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

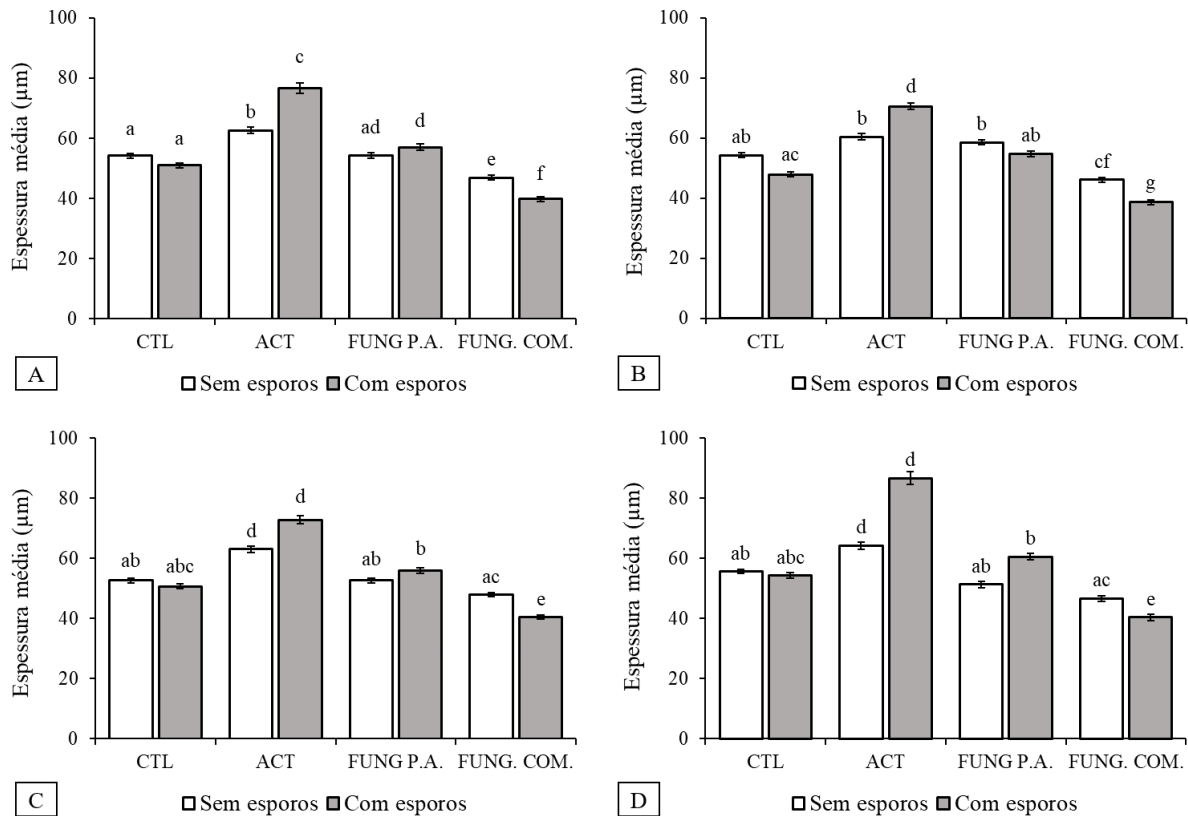
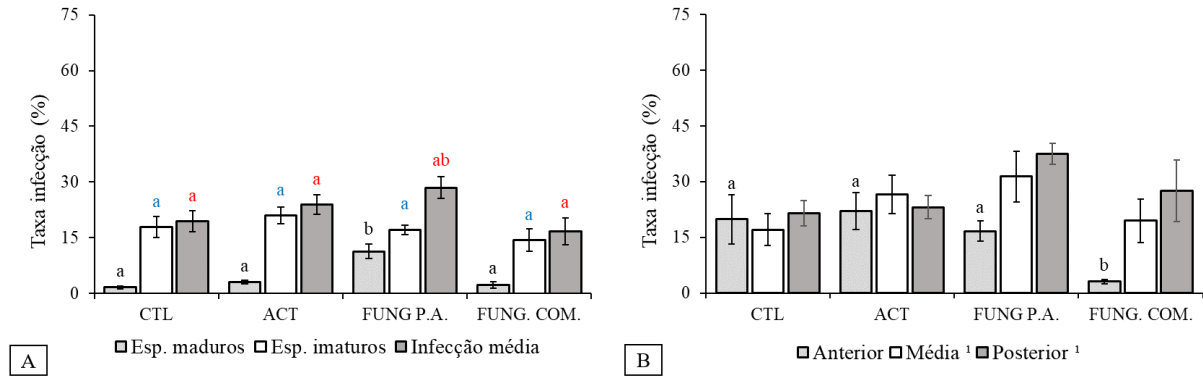


FIGURA 37. Padrão de infecção celular após seis dias da inoculação com esporos de *Nosema ceranae* no intestino médio de *Apis mellifera* africanizada (média  $\pm$  erro padrão). A) Taxa de infecção em diferentes estágios do desenvolvimento do patógeno por tratamento; B) Taxa de infecção por região do intestino médio. <sup>1</sup>Não há diferença significativa entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ). Letras da mesma cor representam diferenças significativas entre os grupos experimentais. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida formulação comercial, Esp - esporo.



### 3.3.3 Reação de TUNEL

Os grupos não expostos ao fungicida, sem ou com o patógeno, não apresentaram imunomarcção positiva para fragmentação do DNA nas células epiteliais (Figura 38B e 39B). Como esperado, células já liberadas no lúmen intestinal tiveram imunomarcção positiva (Figura 39B). No epitélio intestinal dos indivíduos expostos ao princípio ativo do fungicida piraclostrobina foi observado imunomarcção positiva de núcleos com fragmentação do DNA por todo o epitélio, na ausência (Figura 38C) e na presença do patógeno (Figura 39C). Além disso, nesse grupo sem esporo houve imunomarcção positiva para núcleos de células na região de diferenciação celular ao redor dos ninhos de células regenerativas.

A exposição à formulação comercial do fungicida, sem e com esporo, também aumentou a frequência de células positivas à fragmentação do DNA em relação ao controle e observou-se fragmentação de núcleos (Figura 38D e 39D) e núcleo de células na área de diferenciação celular com imunomarcção positiva. Sem o patógeno também foi observado núcleos de células musculares com fragmentação do DNA.

FIGURA 38. Detecção de fragmentação de DNA pela reação de TUNEL no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e sem inoculação de esporos de *Nosema ceranae* na fase adulta. A) Epitélio ventricular sem exposição aos agrotóxicos com núcleos marcados com Dapi; B) Reação de TUNEL com marcação negativa nos grupos controle e controle solvente; C) Reação de TUNEL com marcação positiva no epitélio ventricular exposto ao fungicida (princípio ativo); D) Reação de TUNEL com marcação positiva no epitélio ventricular exposto ao fungicida comercial. ep: epitélio, lm: lúmen, tm: túbulo de Malpighi, seta branca = marcação positiva da reação de TUNEL em célula digestiva.

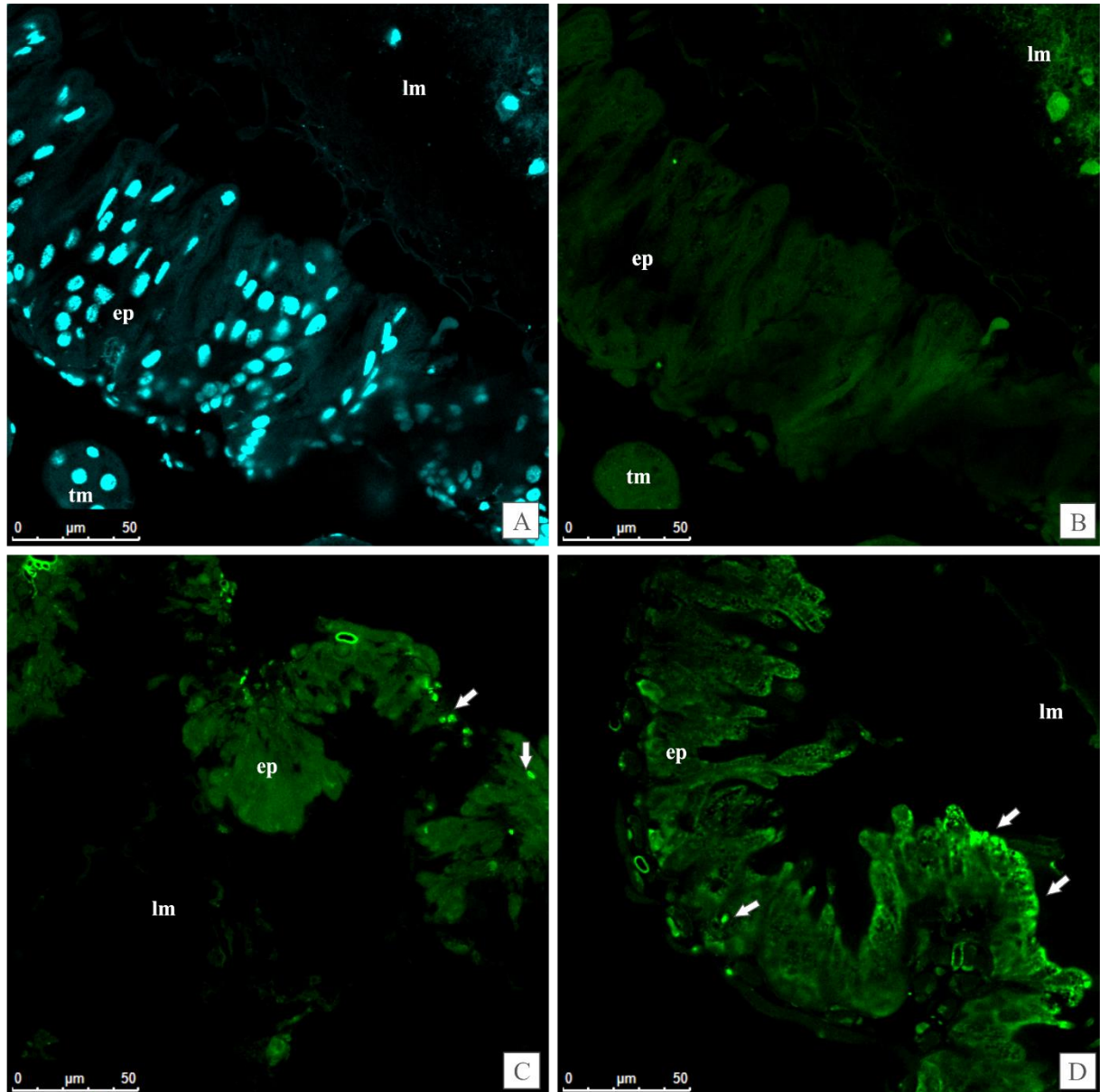
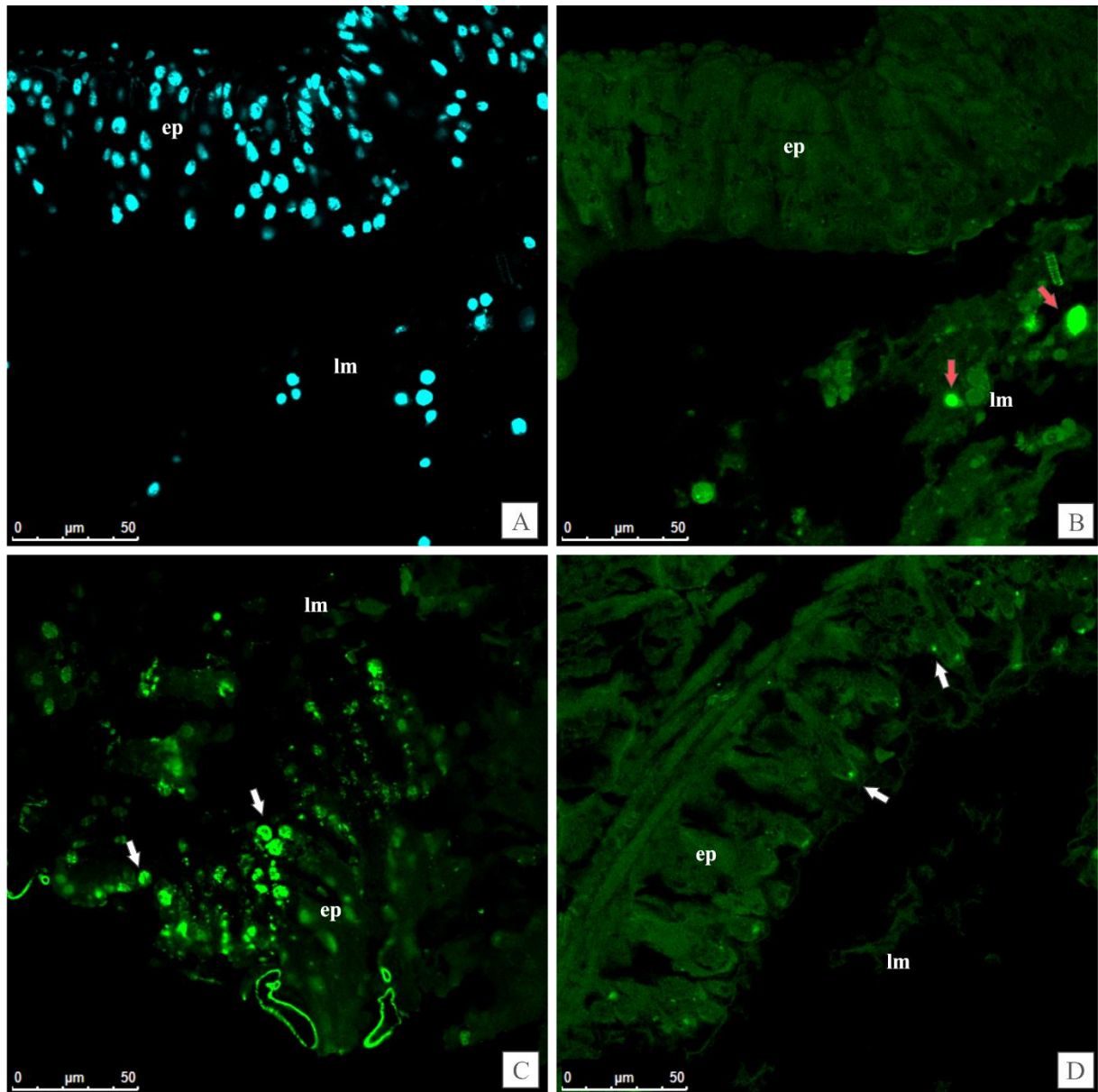


FIGURA 39. Detecção de fragmentação de DNA pela reação de TUNEL no epitélio ventricular de abelhas expostas aos agrotóxicos durante a fase larval e com inoculação de esporos de *Nosema ceranae* na fase adulta. A) Epitélio ventricular sem exposição aos agrotóxicos com núcleos marcados com Dapi; B) Reação de TUNEL negativa no epitélio ventricular dos grupos controles; C) Reação de TUNEL com marcação positiva no epitélio ventricular exposto ao fungicida (princípio ativo); D) Reação de TUNEL com marcação positiva no epitélio ventricular exposto ao fungicida comercial. ep: epitélio, lm: lúmen, seta branca = marcação positiva da reação de TUNEL em célula digestiva, seta vermelha = marcação positiva da reação de TUNEL em célula liberada no lúmen.



### 3.3.4 Quantificação de HSP70

A exposição ao fungicida na fase larval dobrou a intensidade da imunomarcagem de HSP70 no intestino médio das abelhas adultas (Figura 40,  $P < 0,001$ ). Os grupos expostos ao agrotóxico (princípio ativo e formulação comercial) apresentaram valores maiores da

imunomarcaco na ausência do patógeno (Figura 41), sendo que o princípio ativo isolado levou ao maior nível de HSP70 entre os grupos experimentais. A infeco pelo patógeno *Nosema ceranae* aumentou a intensidade de imunomarcaco de HSP70, nos grupos não expostos ao fungicida (Figura 42). A combinao da formulao comercial do fungicida com o patógeno reduziu a intensidade de marcao de HSP70 para níveis basais.

FIGURA 40. Intensidade média de marcao específica de HSP70 por imunofluorescência no eptlio ventricular de *Apis mellifera*. A) Valores médios  $\pm$  desvio padrão da intensidade média de HSP70 entre os frames da reconstruo 3D de regiões do eptlio ventricular; B) Valores médios  $\pm$  desvio padrão da intensidade máxima de HSP70 dada pela sobreposio dos frames nas reconstrues 3D de regiões do eptlio ventricular. CTL – controle, ACT – controle acetona, FUNG P.A. – fungicida princípio ativo, FUNG. COM. – fungicida formulao comercial; NEG – controle negativo, sem fluoróforo. Letras representam diferenças significativas entre os grupos experimentais.

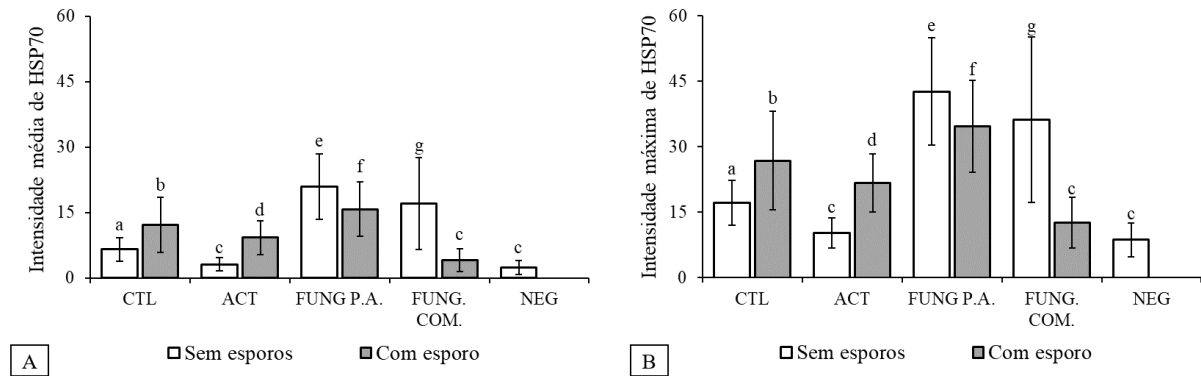


FIGURA 41. Deteco de imunofluorescência positiva para HSP70 a partir de marcao com anticorpo primário e secundário conjugado ao fluoróforo (vermelho) e sobreposio com DAPI (marcao de núcleos – azul) no eptlio instestinal de *A. mellifera* africanizada expostas ao fungicida piraclostrobina na fase larval. A) Controle; B) Controle solvente – acetona; C) Fungicida – princípio ativo; D) Fungicida – formulao comercial; E) Controle negativo, sem o anticorpo primário; F) Controle negativo, sem o anticorpo secundário. ep: eptlio, lm: lúmen.



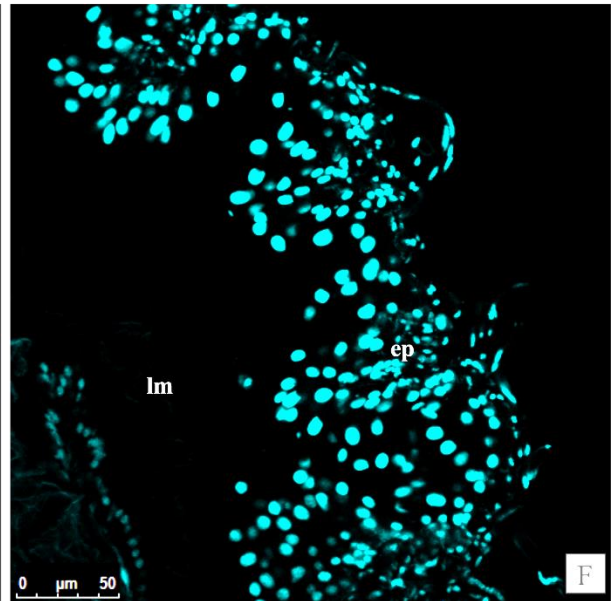
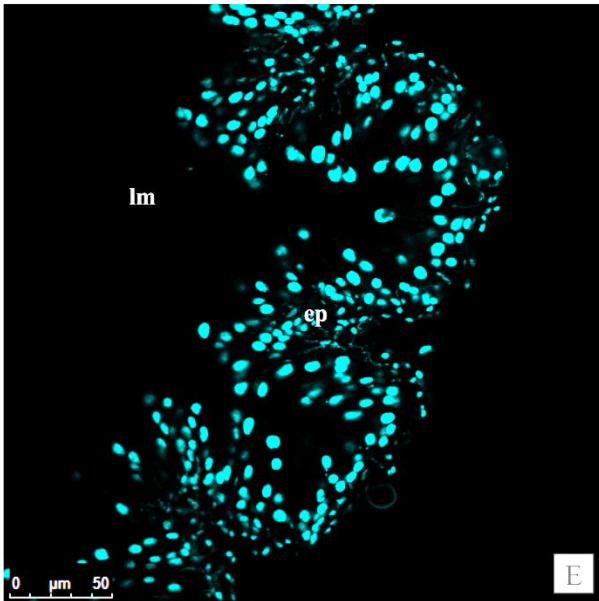
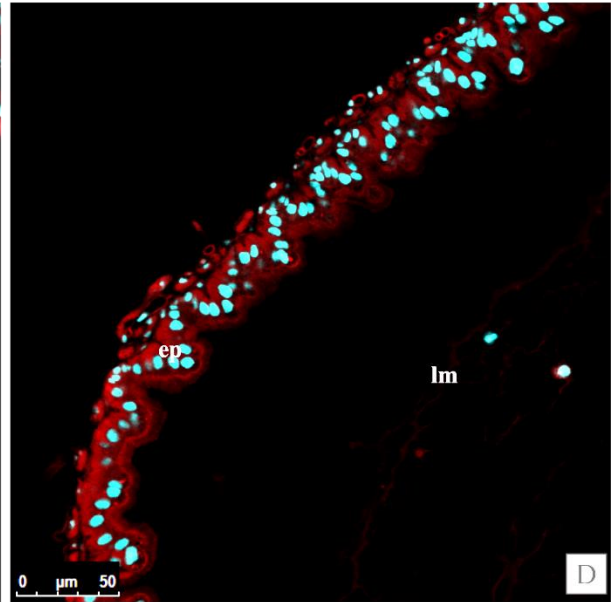
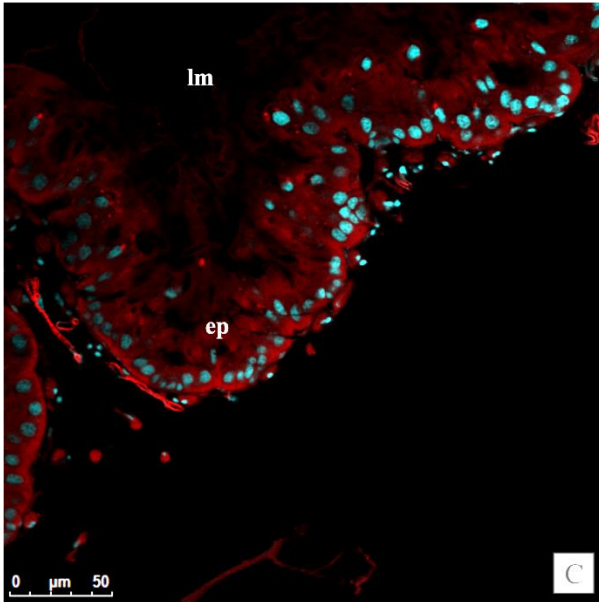
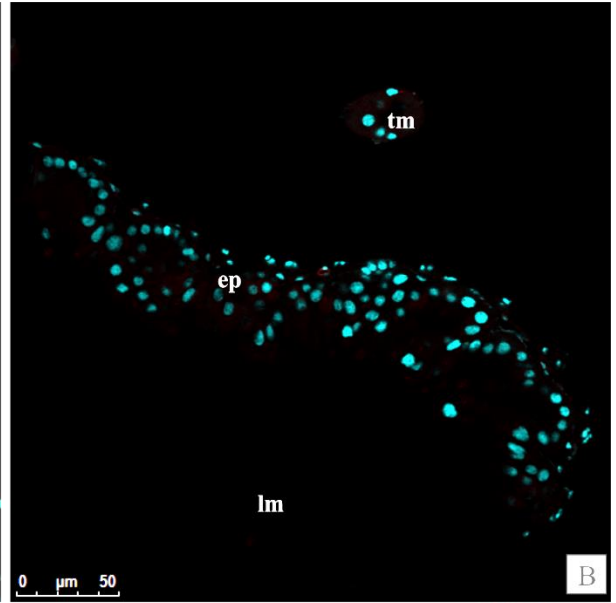
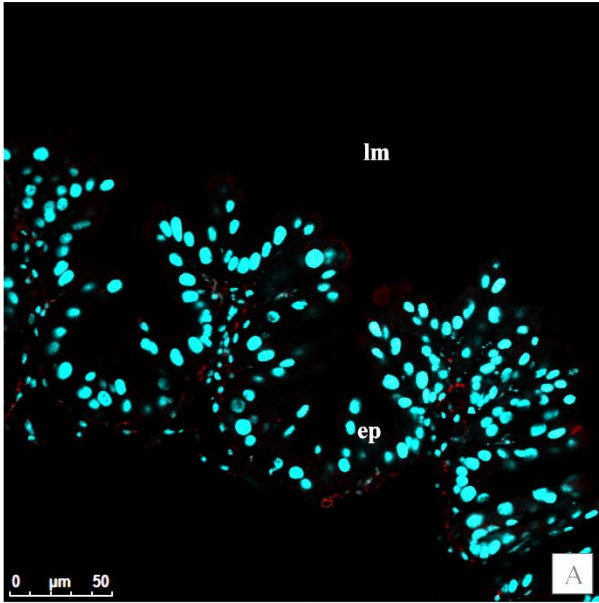
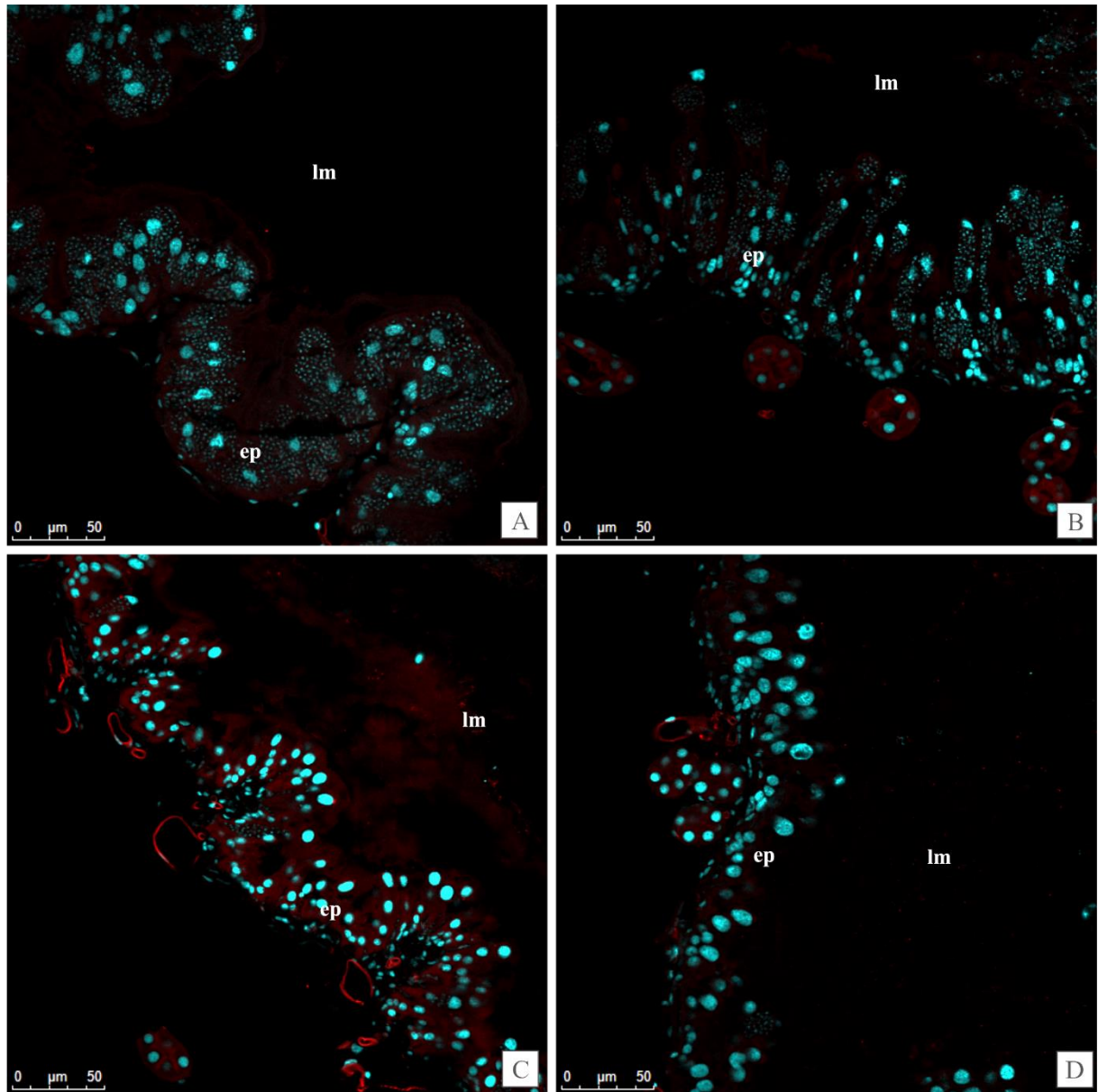


FIGURA 42. Detecção de imunofluorescência positiva para HSP70 a partir de marcação com anticorpo primário e secundário conjugado ao fluoróforo (vermelho) e sobreposição com DAPI (marcação de núcleos – azul) no epitélio instestinal de *A. mellifera* africanizada expostas ao fungicida piraclostrobina na fase larval e ao patógeno *N. ceranae*. A) Controle; B) Controle solvente – acetona; C) Fungicida – princípio ativo; D) Fungicida – formulação comercial. ep: epitélio, lm: lúmen.



### 3.4 DISCUSSÃO

A exposição larval ao fungicida piraclostrobina, princípio ativo isolado e na formulação comercial, não afetou o desenvolvimento e sobrevivência das abelhas ao longo do desenvolvimento e pós-emergência. A ausência de efeitos na sobrevivência também foi observada na exposição larval a baixas doses do fungicida piraclostrobina (TADEI *et al.*, 2019)

e outros fungicidas como ipridiona (CARNEIRO *et al.*, 2020), propiconazol e piraclostrobina + boscalide (WADE *et al.*, 2019).

Entretanto, foi observada alta mortalidade larval no bioensaio realizado no verão quando exposta à formulação comercial. Como os bioensaios foram realizados com as mesmas colônias, as diferenças de sobrevivência podem ter ocorrido por uma interação da exposição à formulação comercial com a diferença da diversidade polínica coletada pelas abelhas, existente entre as estações do ano (MODRO; MARCHINI; MORETI, 2011), a qual pode interferir na saúde das colônias e conseqüentemente na sensibilidade das larvas. A sensibilidade de abelhas aos agrotóxicos pode variar conforme a dieta polínica recebida (SCHMEHL *et al.*, 2014; WAHL; ULM, 1983) e diferenças no nível de pólen da alimentação de uma colônia pode alterar os níveis de oviposição da rainha (FINE *et al.*, 2018) e no desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas de operárias utilizadas na produção de geleia real e *bee bread* (DI PASQUALE *et al.*, 2016). Apesar das larvas terem sido transferidas no primeiro instar larval, ou seja, houve baixo consumo da geleia real proveniente da colônia, estas larvas podem já estarem má nutridas ou com alterações desde a fase da oviposição, visto que um único dia pode gerar estresse nutricional e influenciar no desenvolvimento das abelhas (SCOFIELD; MATTILA, 2015).

De modo geral, os efeitos observados pela exposição larval ao fungicida foram tardios e em nível celular (Quadro 1), podendo não serem notados em uma situação de avaliação de colônias pela mortalidade de abelhas operárias, em condições de campo. A observação de efeitos subletais no intestino médio das abelhas adultas sugere que o fungicida não foi eliminado durante a fase larval, permanecendo no corpo da abelha, o qual pode ter sido mobilizado para os sítios-alvos quando ocorre a remodelação tecidual durante a metamorfose (TADEI *et al.*, 2019) e/ou ter apresentado citotoxicidade nas células regenerativas do intestino larval no primeiro contato com o xenobiótico (fase de alimentação larval), as quais se diferenciam na metamorfose (FRIOL *et al.*, 2017).

O aumento na frequência de núcleos com cromatina compactada e picnóticos no epitélio ventricular das abelhas expostas ao fungicida, sugere que essa exposição na fase larval induziu a morte celular por apoptose nos indivíduos adultos. Observação esta confirmada pela marcação positiva para fragmentação de DNA na reação de Tunel. O grupo exposto a formulação comercial não havia apresentado núcleos picnóticos no epitélio na avaliação histológica, contudo na observação por imunofluorescência houve fragmentação do DNA e do núcleo, indicativos de apoptose (ELMORE, 2007).

A frequência de núcleos picnóticos no ninho de células regenerativas na análise histológica foi maior que núcleos positivos à reação de Tunel observado nessa região. A

fragmentação de DNA é uma etapa mais tardia no processo de morte celular que a compactação do núcleo (DOONAN; COTTER, 2008). Assim, nem todo núcleo picnótico e compacto resultará na morte daquela célula.

Diferentemente do princípio ativo, as alterações histológicas da formulação comercial do fungicida sem o patógeno foram pouco frequentes e com importância patológica baixa. Reduções dos efeitos do princípio ativo por adjuvantes presentes na formulação comercial de agrotóxicos foram observados em inseticidas quando em contato com o crustáceo *Daphnia magna* (MESNAGE; ANTONIOU, 2018), mas não há relatos em insetos. Em abelhas, esta redução dos efeitos deletérios na formulação comercial em comparação ao princípio ativo isolado ainda não tinha sido reportada (MULLIN *et al.*, 2015). Contudo, pode-se afirmar que a formulação comercial também apresentou citotoxicidade para o intestino médio das abelhas, com o aumento da fragmentação do DNA, apesar do aumento do nível de HSP70, que exerce efeito citoprotetor. A formulação comercial do piraclostrobina (Comet®) já foi relacionada com a redução da altura de células epiteliais por Zaluski, Justulin e Orsi (2017) em glândulas mandibulares. Alterações na espessura de células epiteliais também foram observadas nesse estudo, porém nas células do intestino médio das abelhas e apenas quando estas foram expostas a formulação comercial. Desse modo, ingredientes inertes presentes nessa formulação também podem apresentar citotoxicidade em organismos não alvos (MULLIN, 2015; MULLIN *et al.*, 2015).

Proteínas de choque térmico ou de estresse (HSP) são expressas em condições fisiológicas normais nas abelhas, estando envolvidas em diversos processos fisiológicos (ŠKERL; GREGORC, 2010). Especificamente a família HSP70 está envolvida no dobramento de peptídeos (BECKMANN; MIZZEN; WELCH, 1990), montagem e transporte de proteínas (JOLY *et al.*, 2010; RASSOW; VOOS; PFANNER, 1995). Em condições de estresse fisiológicos ou químico, a quantidade de HSP70 aumenta como estratégia de sobrevivência da célula (BEERE, 2004; KING; MACRAE, 2015), devido a sua ação citoprotetora, impedindo agregação de proteínas e restabelecendo a conformação nativa de proteínas e consequentemente, suas funções (BUKAU; HORWICH, 1998; PRIYA; SHARMA; GOLOUBINOFF, 2013). Esse aumento foi observado nos grupos expostos ao agrotóxico e nos grupos controles quando inoculados com o patógeno.

QUADRO 1. Comparação entre índices de lesão histológica e alterações imunomarcadas no intestino de *A. mellifera* expostas ao fungicida piraclostrobina com ou sem inoculação de esporos de *Nosema ceranae*. Cores diferentes representam diferença significativa entre os grupos. Setas indicam aumento ou redução da alteração em relação à referência (traço longo), número de setas indicam intensidade da alteração. Vac.: vacuolização; Esp.: espessura; Dif.: diferenciação; Desest.: desestruturização; Vilos.: vilosidade. <sup>1</sup> Redução da espessura do epitélio; <sup>2</sup> Redução da amplitude e frequência de vilosidades; <sup>3</sup> Presença e ausência de imunomarcção, (-): ausência de fragmentação de DNA; (++) fragmentação do DNA no epitélio e ninho; (+++): fragmentação do DNA no epitélio e ninho e fragmentação do núcleo. CTL: controle; ACT: controle solvente; FUNG. P.A.: fungicida princípio ativo; FUNG COM.: fungicida formulação comercial.

		Secreção apócrina	Vac. simples	Núcleo comp.	Lib. células	Esp. epitélio <sup>1</sup>	Dif. do ninho	Redução de ninho	Núcleo picnótico ninho	Núcleo picnótico epitélio	Vac. deg.	Desest. epitelial	Vilos. <sup>2</sup>	HSP70	Frag. DNA <sup>3</sup>
Sem esporos	CTL	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	-
	ACT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	↓	-
	FUNG P.A.	↓	↓	↑	↑↑	—	↑↑↑	↑	—	↑	↑	↑	—	↑↑↑	++
	FUNG. COM.	—	—	—	—	↑	—	—	—	—	—	—	—	↑↑	++++
Com esporos	CTL	—	↓	—	—	—	—	—	—	—	—	↑	—	↑	-
	ACT	—	↓	—	↑	↑	↑	—	—	—	↑↑	↑	—	↑	-
	FUNG P.A.	—	—	—	↑	—	↑↑	—	↑	↑	↑↑	↑	—	↑↑	+
	FUNG. COM.	↓	↓	↑	↑	↑↑	—	↑	↑↑	↑	↑↑	↑↑	↑	↓	++++

A infecção por *N. ceranae* reduz a apoptose como estratégia de proliferação dos esporos nas células hospedeiras (HIGES *et al.*, 2013; KURZE *et al.*, 2018), o aumento de HSP70 pode ter ocorrido pela presença do patógeno como fator estressor e/ou pela modulação do patógeno nas vias apoptóticas, visto que HSP70 tem ação anti-apoptótica (GARRIDO *et al.*, 2001; SILVA-ZACARIN; GREGORC; MORAES, 2006). Contudo, a combinação da exposição ao fungicida com a presença do patógeno alterou esse padrão, reduzindo os níveis de HSP70 em comparação ao grupo exposto sem patógeno, o que pode ocasionar em redução da viabilidade da célula (MOSSER *et al.*, 2000).

A presença de imunomarcagem positiva para fragmentação de DNA e redução de HSP70 para quantidades basais na formulação comercial com o patógeno indicam que a ação protetiva da HSP não foi suficiente para superar a toxicidade da combinação desses estressores, os quais causaram danos gerais no intestino médio, marcados por índices de lesão maiores nos seguintes parâmetros: desestruturação epitelial, vacuolização degenerativa e núcleo picnótico no ninho de células regenerativas, em comparação aos outros grupos experimentais (Quadro 1), de modo que nesse nível de citotoxicidade, as células já apresentavam danos muito grandes para a sua remediação por HSP. A redução de HSP70 foi observada em abelhas expostas a alguns agrotóxicos considerados altamente tóxicos, como os neonicotinóides (KOO *et al.*, 2015; ŠKERL; GREGORC, 2010) e, em outros eucariotos, estudos mostraram que a expressão de HSP70 pode variar dependendo do xenobiótico que o organismo foi exposto (MAHMOOD *et al.*, 2014).

Pettis *et al.* (2013) observaram que em abelhas adultas, o consumo do fungicida piraclostrobina aumentou as taxas de infecção por *Nosema* em três vezes, e níveis mais altos de *Nosema* também foram observados em adultos expostos ao fungicida prochloraz na fase larval (GLAVINIC *et al.*, 2019). Entretanto, nesse trabalho esse efeito na taxa de infecção foi menos pronunciado quando o fungicida foi consumido pela larva, a taxa de infecção celular não aumentou pela exposição ao fungicida, mas houve influência na maturação dos esporos pelo princípio ativo.

A infecção com *N. ceranae* apresentou um efeito aditivo na citotoxicidade do intestino médio. Corroborando com as observações anteriores de que a combinação de fatores estressores pode causar uma sobrecarga de estresse nas abelhas (CORNMANN *et al.*, 2012; GOULSON *et al.*, 2015). Abelhas infectadas com *N. ceranae* podem apresentar estresse energético podendo aumentar o consumo de alimento energético e reduzir o tempo de vida da abelha (MARTÍN-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; MAYACK; NAUG, 2009), porém não foi observada diferença na taxa de alimentação energética e/ou proteica entre os grupos com e sem o patógeno. Quando

abelhas possuem alimentação *ad libitum* diferenças no tempo de vida causados pelo patógeno não aparecem (MAYACK; NAUG, 2009).

Portanto, a exposição ao fungicida piraclostrobina não leva a morte prematura das abelhas, porém pode comprometer processos fisiológicos relacionados com a digestão e absorção de nutrientes realizadas pelo intestino médio (CARNEIRO *et al.*, 2020; DOMINGUES *et al.*, 2017). A exposição a um ou mais estressores pode desencadear uma diversidade de efeitos celulares, este estudo mostrou a importância da avaliação de parâmetros subletais em abelhas expostas à baixas doses de agrotóxicos e do uso de mais de um biomarcador celular para avaliação de efeitos devido à complexidade de respostas.

### 3.5 CONCLUSÃO

A exposição ao fungicida piraclostrobina na fase larval de *Apis mellifera* afetou a morfologia do intestino médio das abelhas adultas subsequentes. A combinação de estressores (exposição ao fungicida e patógeno *Nosema ceranae*) aumentou os danos no epitélio do intestino médio das abelhas, entretanto esses efeitos não afetaram a sobrevivência das abelhas em nenhuma fase do desenvolvimento e pós-emergência. A formulação comercial não aumentou os efeitos citotóxicos do princípio ativo na ausência do patógeno. Entretanto, a junção de adjuvantes da formulação comercial com princípio ativo e patógeno reduziram a intensidade da imunomarcção de HSP70, promovendo a fragmentação de DNA e causando danos na citoarquitetura do intestino médio. Portanto, baixas doses de fungicidas presentes no alimento das larvas (*bee bread*) podem afetar a saúde e comprometer funções fisiológicas das abelhas adultas, organismos não-alvos deste agrotóxico.

### REFERÊNCIAS

- ANDERSON, K. E. *et al.* An emerging paradigm of colony health: Microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). **Insectes Sociaux**, 2011.
- ARTZ, D. R.; PITTS-SINGER, T. L. Effects of Fungicide and Adjuvant Sprays on Nesting Behavior in Two Managed Solitary Bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, e0135688, ago. 2015.
- AUPINEL, P. *et al.* Improvement of artificial feeding in a standard in vitro method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, v. 58, n. 2, p. 107–111, 2005.
- BABENDREIER, D. *et al.* Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, v. 35, n. 3, p. 293–300, maio 2004.

BALBA, H. Review of strobilurin fungicide chemicals. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 42, n. 4, p. 441–451, maio 2007.

BARTLETT, D. W. *et al.* The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, jul. 2002.

BECKMANN, R. P.; MIZZEN, L. A.; WELCH, W. J. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. **Science**, v. 248, n. 4957, p. 850–854, 1990.

BEERE, H. M. “The stress of dying”: The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. **Journal of Cell Science**, jun. 2004.

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

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell Press**, fev. 1998.

CAMPBELL, J. B. *et al.* The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 11–16, 2016.

CARNEIRO, L. S. *et al.* The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, e109991, fev. 2020.

CHEN, J.; MULLIN, C. A. Quantitative determination of trisiloxane surfactants in beehive environments based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Environmental science & technology**, v. 47, n. 16, p. 9317–23, ago. 2013.

CIZELJ, I. *et al.* Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 128, p. 68–75, mar. 2016.

CORNMAN, R. S. *et al.* Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43562, ago. 2012.

CULLEN, M. G. *et al.* Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. **PLOS ONE**, v. 14, n. 12, e0225743, dez. 2019.

DEGRANDI-HOFFMAN, G. *et al.* Effects of Oral Exposure to Fungicides on Honey Bee Nutrition and Virus Levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518–2528, dez. 2015.

DEGRANDI-HOFFMAN, G. *et al.* Honey bee gut microbial communities are robust to the fungicide Pristine® consumed in pollen. **Apidologie**, v. 48, n. 3, p. 340–352, maio 2017.

DIPASQUALE, G. *et al.* Variations in the Availability of Pollen Resources Affect Honey Bee Health. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162818, set. 2016.



- DOMINGUES, C. E. C. *et al.* Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994–1005, 2017.
- DOONAN, F.; COTTER, T. G. Morphological assessment of apoptosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 200–204, mar. 2008.
- EIRI, D. M. *et al.* *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2015.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- FINE, J. D. *et al.* Quantifying the effects of pollen nutrition on honey bee queen egg laying with a new laboratory system. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, e0203444, set. 2018.
- FISHER, A. *et al.* The Synergistic Effects of Almond Protection Fungicides on Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Forager Survival. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 3, p. 802–808, jun. 2017.
- FRIES, I. *et al.* *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, v. 32, n.3 p. 356–365, 1996.
- FRIES, I. *et al.* Standard methods for *Nosema* research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1–28, 2 jan. 2013.
- FRIOL, P. S. *et al.* Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56–66, out. 2017.
- GARRIDO, C. *et al.* Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 286, n. 3, p. 433-442, ago. 2001.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 3, p. 493–501, 1992.
- GLAVINIC, U. *et al.* Response of adult honey bees treated in larval stage with prochloraz to infection with *Nosema ceranae*. **PeerJ**, v. 2019, n. 2, 2019.
- GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.
- HIGES, M. *et al.* Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 4, p. 530–536, 2013.
- HLINA, B. L. *et al.* In Preparation. Changes in the sensitivity of piscicide in an invasive species. **Environmental Science & Technology**, 2018.

- JOHNSON, R. M. *et al.* Pesticides and honey bee toxicity – USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312–331, maio 2010.
- JOLY, A.-L. *et al.* Dual Role of Heat Shock Proteins as Regulators of Apoptosis and Innate Immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 3, p. 238–247, 2010.
- KIM, S. *et al.* Differential expression of acetylcholinesterase 1 in response to various stress factors in honey bee workers. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, dez. 2019.
- KING, A. M.; MACRAE, T. H. Insect Heat Shock Proteins During Stress and Diapause. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 59–75, jan. 2015.
- KOO, J. *et al.* Differential responses of *Apis mellifera* heat shock protein genes to heat shock, flower-thinning formulations, and imidacloprid. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 3, p. 583–589, set. 2015.
- KURZE, C. *et al.* *Nosema* spp. infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2381–2388, jun. 2016.
- KURZE, C. *et al.* Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 154, p. 1–4, maio 2018.
- LONG, E. Y.; KRUPKE, C. H. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. **Nature Communications**, v. 7, n. May, p. 1–12, 2016.
- MAHMOOD, K. *et al.* Synergistic effects of toxic elements on heat shock proteins. **BioMed Research International**, e564136, 2014.
- MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 605–612, set. 2011.
- MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 3, p. 185–188, mar. 2009.
- MESNAGE, R.; ANTONIOU, M. N. Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. **Frontiers in Public Health**, v. 5, jan. 2018.
- MODRO, A. F. H.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. DE C. C. Origem botânica de cargas de pólen de colmeias de abelhas africanizadas em Piracicaba, SP. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 11, p. 1944–1951, nov. 2011.
- MOSSER, D. D. *et al.* The Chaperone Function of hsp70 is Required for Protection against Stress-Induced Apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 19, p. 7146–7159, out. 2000.
- MULLIN, C. A. *et al.* High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honey Bee Health. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, 2010.
- MULLIN, C. A. *et al.* The formulation makes the honey bee poison. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 27–35, maio 2015.

MULLIN, C. A. Effects of “inactive” ingredients on bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 194-200, jul. 2015.

MULLIN, C. A. *et al.* Toxicological Risks of Agrochemical Spray Adjuvants: Organosilicone Surfactants May Not Be Safe. **Frontiers in Public Health**, v. 4, p. 1–8, 2016.

OECD. Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Repeated Exposure, n° 239. **OECD Environment, Health and Safety Publications**, 2016.

OLIVEIRA, C. R. *et al.* Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. **Chemosphere**, v. 236, e. 124282, dez. 2019.

OSTIGUY, N. *et al.* Honey bee exposure to pesticides: A four-year nationwide study. **Insects**, 2019.

PETTIS, J. S. *et al.* Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70182, 24 jul. 2013.

PRIYA, S.; SHARMA, S. K.; GOLOUBINOFF, P. Molecular chaperones as enzymes that catalytically unfold misfolded polypeptides. **FEBS Letters**, v. 587, n. 13, p. 1981-1987, jun. 2013.

RAIMETS, R. *et al.* Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. **Chemosphere**, v. 238, jan. 2020.

RASSOW, J.; VOOS, W.; PFANNER, N. Partner proteins determine multiple functions of Hsp70. **Trends in cell biology**, v. 5, n. 5, p. 207–12, maio 1995.

SCHMEHL, D. R. *et al.* Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Insect Physiology**, v. 71, p. 177–190, 1 dez. 2014.

SCOFIELD, H. N.; MATTILA, H. R. Honey Bee Workers That Are Pollen Stressed as Larvae Become Poor Foragers and Waggle Dancers as Adults. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0121731, abr. 2015.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. *et al.* Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. Spain: Formatex R ed. Badajoz, 2012. p. 696–703.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; GREGORC, A.; MORAES, R. L. M. S. In situ localization of heat-shock proteins and cell death labelling in the salivary gland of acaricide-treated honeybee larvae. **Apidologie**, v. 37, n. 5, p. 507–516, set. 2006.

SIMON-DELISO, N. *et al.* Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–16, 2014.

ŠKERL, M. I. S.; GREGORC, A. Heat shock proteins and cell death in situ localisation in hypopharyngeal glands of honeybee (*Apis mellifera carnica*) workers after imidacloprid or coumaphos treatment. **Apidologie**, v. 41, n. 1, p. 73–86, jan. 2010.

SPIVAK, M. *et al.* The Plight of the Bees †. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 34–38, jan. 2011.

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3277, 2019.

THERNEAU, T. M. **A Package for Survival Analysis in S**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=survival>>.

THERNEAU, T. M.; GRAMBSCH, P. M. **Modeling Survival Data: Extending the Cox Model**. Springer ed. New York: 2000, p. 356.

THOMPSON, H. M. *et al.* Potential impacts of synergism in honeybees (*Apis mellifera*) of exposure to neonicotinoids and sprayed fungicides in crops. **Apidologie**, v. 45, n. 5, p. 545–553, set. 2014.

TOSI, S. *et al.* A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides. **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 208–218, 15 fev. 2018.

WADE, A. *et al.* Combined toxicity of insecticides and fungicides applied to California almond orchards to honey bee larvae and adults. **Insects**, v. 10, n. 1, jan. 2019.

WAHL, O.; ULM, K. Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. **Oecologia**, v. 59, n. 1, p. 106–128, ago. 1983.

YODER, J. A. *et al.* Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 76, n. 10, p. 587–600, maio 2013.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. D. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os agrotóxicos utilizados nesse estudo apresentaram efeitos subletais tardios que foram diagnosticados por meio da análise histopatológica do intestino médio das abelhas adultas, indicando que não houve eliminação e/ou desintoxicação total dos xenobióticos durante a metamorfose e emergência. Durante a alimentação larval, os xenobióticos provavelmente foram armazenados no interior de tecidos, não sendo eliminados durante a defecação, o que explicaria o efeito tardio. O fungicida piraclostrobina que possui baixa solubilidade em água (NCBI, 2017) e os neonicotinóides podem se acumular no corpo gorduroso da larva (FENG *et al.*, 2017). Esse armazenamento pode resultar em estresse contínuo para os indivíduos durante o desenvolvimento, diferentemente de abelhas adultas que realizam a excreção de resíduos tóxicos pela defecação regular (ZHU *et al.*, 2014). Assim, os agrotóxicos absorvidos na fase larval permanecem no organismo da abelha, sendo mobilizados para os sítios-alvos durante a metamorfose (TADEI *et al.*, 2019), podendo ter seu efeito nos órgãos, tais como o intestino, quando ocorre a remodelação tecidual.

Portanto, os agrotóxicos testados interferem na remodelação intestinal durante a metamorfose. Dentre os agrotóxicos, em ordem decrescente de citotoxicidade: I) a clotianidina apresentou a maior citotoxicidade alterando a citoarquitetura e a capacidade regenerativa do intestino médio das abelhas na fase adulta, o que pode ter levado a redução da longevidade; II) o fungicida na formulação comercial alterou a estrutura epitelial, reduzindo sua espessura; III) o princípio ativo do fungicida promoveu o aumento de efeitos relacionados a recuperação do epitélio intestinal; IV) a combinação dos princípios ativos apresentou a menor citotoxicidade no intestino médio.

Apesar de apresentar uma menor citotoxicidade, quando os indivíduos co-expostos aos agrotóxicos tiveram contato com mais um fator estressor, o patógeno *Nosema ceranae*, houve aumento das lesões no intestino médio. As abelhas estão expostas a uma combinação de fatores estressores diariamente (GOULSON *et al.*, 2015), esse estudo possibilitou observar respostas subletais dessa exposição.

Os resultados desse estudo reforçam a hipótese inicial que a exposição à baixas doses de agrotóxicos na fase larval causaram prejuízos na estrutura celular do intestino médio dessas abelhas na fase adulta, alterando o padrão de infecção e as respostas celulares ao patógeno *Nosema ceranae*.

A observação de efeitos subletais na sobrevivência (exposição ao neonicotinóide) e em nível celular mostram a importância de uma avaliação mais robusta dos efeitos de agrotóxicos

em organismos não-alvos. Segundo decreto nº 5.981 de 2006 (BRASIL, 2006), testes ecotoxicológicos em organismos terrestres, entre eles abelhas adultas e em larvas (portaria IBAMA nº 84/1996, instrução normativa nº 2/2017 - BRASIL, 2017) devem ser realizados para avaliação de risco de um agrotóxico a ser registrado, porém os parâmetros observados são apenas a mortalidade (DL50) após um curto período da exposição (até 96 horas) (CHAM *et al.*, 2017). Esse trabalho mostrou que os efeitos apareceram apenas em fases futuras e, portanto, não seriam notados nas fases regulatórias desses compostos. As abelhas possuem uma complexidade ecológica que deve ser levada em consideração em futuras avaliações.

## REFERÊNCIAS

- ADL, S. M. *et al.* The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 399–451, out. 2005.
- ALAUX, C. *et al.* Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 774–782, 2010.
- ALAUX, C. *et al.* Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen physiology (*Apis mellifera*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, n. 3, p. 380–385, mar. 2011.
- ALKASSAB, A. T.; KIRCHNER, W. H. Assessment of acute sublethal effects of clothianidin on motor function of honeybee workers using video-tracking analysis. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. August 2017, p. 200–205, 2018.
- AMDAM, G. V.; OMHOLT, S. W. The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 223, n. 4, p. 451–464, ago. 2003.
- ANDRADE, A. S. *et al.* Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em municípios do alto Paranaíba-MG. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1129–1135, 2011.
- ANTÚNEZ, K. *et al.* Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*). **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 9, p. 2284–2290, set. 2009.
- ARTZ, D. R.; PITTS-SINGER, T. L. Effects of Fungicide and Adjuvant Sprays on Nesting Behavior in Two Managed Solitary Bees, *Osmia lignaria* and *Megachile rotundata*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135688, ago. 2015.

- BABENDREIER, D. *et al.* Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, v. 35, n. 3, p. 293–300, maio 2004.
- BAILEY, J. *et al.* Contact and oral toxicity to honey bees (*Apis mellifera*) of agents registered for use for sweet corn insect control in Ontario, Canada. **Apidologie**, v. 36, n. 4, p. 623–633, out. 2005.
- BALBA, H. Review of strobilurin fungicide chemicals. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 42, n. 4, p. 441–451, maio 2007.
- BARTLETT, D. W. *et al.* The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649–662, jul. 2002.
- BENVAU, L. R.; NIEH, J. C. Larval honey bees infected with *Nosema ceranae* have increased vitellogenin titers as young adults. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017.
- BEYER, M. *et al.* Pesticide residue profiles in bee bread and pollen samples and the survival of honeybee colonies—a case study from Luxembourg. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 32, p. 32163–32177, nov. 2018.
- BOBIS, O. *et al.* Beebread from *Apis mellifera* and *Apis dorsata*. Comparative Chemical Composition and Bioactivity. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science and Biotechnologies**, v. 74, n. 1, p. 43, maio 2017.
- BÖHME, F. *et al.* Chronic exposure of honeybees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), to a pesticide mixture in realistic field exposure rates. **Apidologie**, v. 48, n. 3, p. 353–363, 2017.
- BORTOLOTTI, L. *et al.* Effects of sub-lethal imidacloprid doses on the homing rate and foraging activity of honey bees. **Bulletin of Insectology**, v. 56, n. 1, p. 63–67, 2003.
- BOUNIAS, M.; MOREAU, R.; GOURDOUX, L. Effects of honeybee insulin-immunoreactive peptide on haemolymph lipid and carbohydrate. Interaction of vertebrate somatostatin. **Insect Biochemistry**, v. 16, n. 4, p. 721–731, 1986.
- BRANDT, A. *et al.* The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 40–47, 2016.
- BRASIL. **Decreto N° 5.981 de 6 de dezembro de 2006**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5981.htm#art7](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5981.htm#art7)>. Acesso em: 6 fev. 2020.
- BRASIL. Instrução Normativa N° 2 de 09 de fevereiro de 2017. Ministério do Meio Ambiente, 2017.
- BRUCKNER, S. *et al.* **Honey Bee Colony Losses 2018-2019: Preliminary Results**. Disponível em: <<https://beeinformed.org/results/2018-2019/>>. Acesso em: 1 ago. 2019.
- BUDGE, G. E. *et al.* Evidence for pollinator cost and farming benefits of neonicotinoid seed coatings on oilseed rape. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12574, dez. 2015.

BYRNE, F. J. *et al.* Determination of exposure levels of honey bees foraging on flowers of mature citrus trees previously treated with imidacloprid. **Pest Management Science**, v. 70, n. 3, p. 470–482, mar. 2014.

CALDERONE, N. W. Insect Pollinated Crops, Insect Pollinators and US Agriculture: Trend Analysis of Aggregate Data for the Period 1992–2009. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37235, maio 2012.

CAMPBELL, J. B. *et al.* The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 11–16, 2016.

CHAM, K. DE O. *et al.* **Manual de Avaliação de Risco Ambiental de Agrotóxicos para Abelhas**. Brasília: IBAMA, 2017.

CHARPENTIER, G. *et al.* Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared *in vitro*. **Pest Management Science**, v. 70, n. 1, p. 140–147, jan. 2014.

CHEN, Y. P. *et al.* Morphological, molecular, and phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite isolated from the European honey bee, *Apis mellifera*. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 142–147, 2009.

CLAUDIANOS, C. *et al.* A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. **Insect molecular biology**, v. 15, n. 5, p. 615–36, out. 2006.

CORNMAN, R. S. *et al.* Pathogen Webs in Collapsing Honey Bee Colonies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e43562, 21 ago. 2012.

COULON, M. *et al.* Metabolisation of thiamethoxam (a neonicotinoid pesticide) and interaction with the Chronic bee paralysis virus in honeybees. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 144, p. 10–18, jan. 2018.

COUSIN, M. *et al.* Size Changes in Honey Bee Larvae Oenocytes Induced by Exposure to Paraquat at Very Low Concentrations. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, e65693, 28 maio 2013.

CRUZ-LADIM, C. **Abelhas: morfologia e funções de sistemas**. 1. ed. São Paulo: UNESP, 2009.

DAINAT, B. *et al.* Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, e32151, 23 fev. 2012.

DECOURTYE, A. *et al.* Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 78, n. 2, p. 83–92, fev. 2004 a.

DEGRANDI-HOFFMAN, G. *et al.* Effects of Oral Exposure to Fungicides on Honey Bee Nutrition and Virus Levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518–2528, dez. 2015.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; SIMONDS, R. The effects of pesticides on queen rearing and virus titers in honey bees (*Apis mellifera* L.). **Insects**, 2013.



DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-M. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, n. 1, p. 81–106, jan. 2007.

DIPASQUALE, G. et al. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e72016, ago. 2013.

DIVELY, G. P.; KAMEL, A. Insecticide Residues in Pollen and Nectar of a Cucurbit Crop and Their Potential Exposure to Pollinators. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 18, p. 4449–4456, maio 2012.

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

DUSSAUBAT, C. et al. Combined neonicotinoid pesticide and parasite stress alter honeybee queens' physiology and survival. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, e31430, nov. 2016.

EIRI, D. M. et al. *Nosema ceranae* can infect honey bee larvae and reduces subsequent adult longevity. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2015.

FENG, Y. et al. Mid-Infrared Spectroscopy Study of Effects of Neonicotinoids on Forager Honey Bee (*Apis mellifera*) Fat Bodies and Their Connection to Colony Collapse Disorder. **bioRxiv**, e205112, 18 out. 2017.

FERNANDES, K. M. et al. Quantitative analysis of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 56, p. 490–505, 2010.

FINE, J. D.; COX-FOSTER, D. L.; MULLIN, C. A. An inert pesticide adjuvant synergizes viral pathogenicity and mortality in honey bee larvae. **Scientific Reports**, v. 7, n. September 2016, p. 1–9, 2017.

FRIES, I. et al. *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae). **European Journal of Protistology**, v. 32, n. 3, p. 356–365, 1996.

FRIES, I. et al. Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. **Journal of Apicultural Research**, v. 45, n. 4, p. 230–233, jan. 2006.

FRIOL, P. S. et al. Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56–66, out. 2017.

GAGE, S. L. et al. *Nosema ceranae* parasitism impacts olfactory learning and memory and neurochemistry in honey bees (*Apis mellifera*). **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb161489, fev. 2018.

GARY, N. et al. The africanized honey bee : ahead of schedule. **Californ. Agri.**, n. December, p. 4–7, 1985.

GISDER, S. *et al.* Five-year cohort study of *Nosema* spp. in Germany: Does climate shape virulence and assertiveness of *Nosema ceranae*? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 3032–3038, maio 2010.

GISDER, S. *et al.* A cell culture model for *Nosema ceranae* and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important honey bee-pathogenic microsporidia. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 404–413, fev. 2011.

GOBLIRSCH, M.; HUANG, Z. Y.; SPIVAK, M. Physiological and Behavioral Changes in Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by *Nosema ceranae* Infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

GOULSON, D. REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 4, p. 977–987, ago. 2013.

GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, 2015.

GREGORC, A. *et al.* Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. **Chemosphere**, v. 147, p. 328–336, mar. 2016.

GREGORC, A.; SILVA-ZACARIN, E.; NOCELLI, R. Cellular Response in Honey Bees to Non-Pathogenic Effects of Pesticides. In: **Honey Bee Colony Healthy**. [s.l.: s.n.]. p. 161–180.

GYÖRI, J. *et al.* Inhibitory effects of four neonicotinoid active ingredients on acetylcholine esterase activity. **Acta Biologica Hungarica**, v. 68, n. 4, p. 345–357, 2017.

HENRY, M. *et al.* A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348–350, 20 abr. 2012.

HERBERT JR, E. W. *et al.* Chemical composition and nutritive value of bee-collected and bee-stored pollen. **Apidologie**, v. 9, n. 1, p. 33–40, 1978.

HERNANDO, M. D. *et al.* Viability of honeybee colonies exposed to sunflowers grown from seeds treated with the neonicotinoids thiamethoxam and clothianidin. **Chemosphere**, v. 202, n. 485, p. 609–617, 2018.

HIGES, M. *et al.* Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 94, n. 3, p. 211–217, 2007.

HIGES, M. *et al.* How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2659–2669, 2008.

HIGES, M. *et al.* Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 2, p. 110–113, 2009.

HIGES, M. *et al.* Apoptosis in the pathogenesis of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 4, p. 530–536, 2013.

HOLT, H. L.; ARONSTEIN, K. A.; GROZINGER, C. M. Chronic parasitization by *Nosema microsporidia* causes global expression changes in core nutritional, metabolic and behavioral pathways in honey bee workers (*Apis mellifera*). **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 799, 18 nov. 2013.

HUANG, W.-F.; SOLTER, L. F. Comparative development and tissue tropism of *Nosema apis* and *Nosema ceranae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 113, n. 1, p. 35–41, maio 2013.

HUNG, K. J. *et al.* The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proc. R. Soc. B.**, v. 285, e20172140, 2018.

IWASA, T. *et al.* Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. **Crop Protection**, v. 23, n. 5, p. 371–378, maio 2004.

JOHNSON, B. R. Within-nest temporal polyethism in the honey bee. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 62, n. 5, p. 777–784, mar. 2008.

JOHNSON, B. R. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 64, n. 3, p. 305–316, jan. 2010.

JOHNSON, R. M. *et al.* Pesticides and honey bee toxicity – USA. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 312–331, maio 2010.

KAFTANOGLU, O.; LINKSVAYER, T. A; PAGE, R. E. Rearing honey bees, *Apis mellifera*, in vitro 1: effects of sugar concentrations on survival and development. **Journal of insect science (Online)**, v. 11, n. 96, p. 96, 2011.

KESSLER, S. C. *et al.* Bees prefer foods containing neonicotinoid pesticides. **Nature**, v. 521, n. 7550, p. 74–76, 2015.

KILJANEK, T. *et al.* Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – Preliminary exposure assessment. **Chemosphere**, v. 175, p. 36–44, 2017.

KRUPKE, C. H. *et al.* Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, e29268, jan. 2012.

KURZE, C. *et al.* *Nosema* tolerant honeybees (*Apis mellifera*) escape parasitic manipulation of apoptosis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–9, 2015.

KURZE, C. *et al.* *Nosema spp.* infections cause no energetic stress in tolerant honeybees. **Parasitology Research**, v. 115, n. 6, p. 2381–2388, jun. 2016.

KURZE, C. *et al.* Infection dynamics of *Nosema ceranae* in honey bee midgut and host cell apoptosis. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 154, p. 1–4, maio 2018.

LECOCQ, A. *et al.* Parasite infection accelerates age polyethism in young honey bees. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, e22042, abr. 2016.

LEE, K. V. *et al.* A national survey of managed honey bee 2013–2014 annual colony losses in the USA. **Apidologie**, v. 46, n. 3, p. 292–305, maio 2015.

LENTOLA, A. *et al.* Ornamental plants on sale to the public are a significant source of pesticide residues with implications for the health of pollinating insects. **Environmental Pollution**, v. 228, p. 297–304, 2017.

LEVIN, M. D. Value of Bee Pollination to U.S. Agriculture. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 29, n. 4, p. 50–51, dez. 1983.

LI, W.; CHEN, Y.; COOK, S. C. Chronic *Nosema ceranae* infection inflicts comprehensive and persistent immunosuppression and accelerated lipid loss in host *Apis mellifera* honey bees. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 6, p. 433–444, 2018.

LIMA, M. A. P. *et al.* Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. **Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology**, v. 202, n. 9–10, p. 733–47, out. 2016.

LONG, E. Y.; KRUPKE, C. H. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. **Nature Communications**, v. 7, n. May, p. 1–12, 2016.

MAO, W.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 10, p. 2538–2543, 2017.

MAPA. **AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 9 jul. 2019.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Effect of temperature on the biotic potential of honeybee microsporidia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 8, p. 2554–2557, 2009.

MARTÍN-HERNÁNDEZ, R. *et al.* Comparison of the energetic stress associated with experimental *Nosema ceranae* and *Nosema apis* infection of honeybees (*Apis mellifera*). **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 605–612, set. 2011.

MARTINS, G. F. *et al.* The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron (Oxford, England : 1993)**, v. 37, n. 2, p. 161–8, 2006.

MAYACK, C.; NATSOPOULOU, M. E.; MCMAHON, D. P. *Nosema ceranae* alters a highly conserved hormonal stress pathway in honeybees. **Insect Molecular Biology**, v. 24, n. 6, p. 662–670, dez. 2015.

MAYACK, C.; NAUG, D. Energetic stress in the honeybee *Apis mellifera* from *Nosema ceranae* infection. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 100, n. 3, p. 185–188, mar. 2009.

MEANA, A.; MARTÍN-HERNÁNDEZ, R.; HIGES, M. The reliability of spore counts to diagnose *Nosema ceranae* infections in honey bees. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 2, p. 212–214, 2010.

MENGONI GOÑALONS, C.; FARINA, W. M. Effects of Sublethal Doses of Imidacloprid on Young Adult Honeybee Behaviour. **PLOS ONE**, v. 10, e0140814, out. 2015.

MESSAN, M. R.; PAGE, R. E.; KANG, Y. Effects of vitellogenin in age polyethism and population dynamics of honeybees. **Ecological Modelling**, v. 388, p. 88–107, nov. 2018.

MICHELETTE, E. R. F.; SOARES, A. E. E. Characterization of preimaginal developmental stages in Africanized honey bee workers (*Apis mellifera* L). **Apidologie**, v. 24, n. 4, p. 431–440, 1993.

MULLIN, C. A. *et al.* Toxicological Risks of Agrochemical Spray Adjuvants: Organosilicone Surfactants May Not Be Safe. **Frontiers in Public Health**, v. 4, p. 1–8, 2016.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). **Pyraclostrobin** | **C19H18ClN3O4** - **PubChem**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6422843>>. Acesso em: 13 dez. 2018.

NICHOLLS, E. *et al.* Larval exposure to field-realistic concentrations of clothianidin has no effect on development rate, over-winter survival or adult metabolic rate in a solitary bee, *Osmia bicornis*. **PeerJ**, v. 5, p. e3417, 2017.

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

ODEMER, R. *et al.* Sublethal effects of clothianidin and *Nosema spp.* on the longevity and foraging activity of free flying honey bees. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 5, p. 527–538, jul. 2018.

OECD. Test No. 237: Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Single Exposure. **OECD Environment, Health and Safety Publications**, 2013.

OECD. Honey Bee (*Apis mellifera*) Larval Toxicity Test, Repeated Exposure, nº 239. **OECD Environment, Health and Safety Publications**, 2016.

OIE. Nosemosis of Honey Bees. In: **Terrestrial Manual**, [s.l: s.n.], 2018.

OLIVEIRA, R. C. *et al.* Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. **Chemosphere**, v. 163, p. 525–534, nov. 2016.

PANEK, J. *et al.* Impact of the microsporidian *Nosema ceranae* on the gut epithelium renewal of the honeybee, *Apis mellifera*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 27 set. 2018.

PANSERI, S. *et al.* Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. **Food Control**, v. 38, n. 1, p. 150–156, 2014.

PAXTON, R. J. *et al.* *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. **Apidologie**, v. 38, n. 6, p. 558–565, 2007.

PENG, Y.-C.; YANG, E.-C. Sublethal Dosage of Imidacloprid Reduces the Microglomerular Density of Honey Bee Mushroom Bodies. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, e19298, maio 2016.

PERNAL, S. **CAPA Statement on Honey Bees Losses in Canada (Spring 2008)**. Canadian Association of Professional Apiculturists. 2009. Disponível em: <<http://www.capabees.com/shared/2013/02/08canbeelossreport.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2018.

PETTIS, J. S. *et al.* Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, e70182, jul. 2013.

PIIROINEN, S.; GOULSON, D. Chronic neonicotinoid pesticide exposure and parasite stress differentially affects learning in honeybees and bumblebees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1828, abr. 2016.

PILLING, E. *et al.* A Four-Year Field Program Investigating Long-Term Effects of Repeated Exposure of Honey Bee Colonies to Flowering Crops Treated with Thiamethoxam. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, e77193, out. 2013.

PIRES, C. S. S. *et al.* Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesq. agropec. Bras.**, v. 51, n. 5, p. 422–442, 2016.

POHORECKA, K. *et al.* Residues of Neonicotinoid Insecticides in Bee Collected Plant Materials from Oilseed Rape Crops and their Effect on Bee Colonies. **Journal of Apicultural Science**, v. 56, n. 2, 2012.

POHORECKA, K. *et al.* The exposure of honey bees to pesticide residues in the hive environment with regard to winter colony losses. **Journal of Apicultural Science**, v. 61, n. 1, p. 105–125, 2017.

PRISCO, G. *et al.* Neonicotinoid clothianidin adversely affects insect immunity and promotes replication of a viral pathogen in honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 46, p. 18466–18471, 2013.

RAES, H.; VERBEKE, M. Light and electron microscopical study of two types of endocrines cell in the midgut of the adult worker honeybee (*Apis mellifera*). **Tissue and Cell**, v. 26, n. 2, p. 223–230, 1 abr. 1994.

RAIMETS, R. *et al.* Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. **Chemosphere**, v. 238, jan. 2020.

RAND, E. E. D. *et al.* Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. **Scientific Reports**, v. 5, n. January, p. 1–11, 2015.

REIM, T.; SCHEINER, R. Division of labour in honey bees: age- and task-related changes in the expression of octopamine receptor genes. **Insect Molecular Biology**, v. 23, n. 6, p. 833–841, dez. 2014.

RETSCHNIG, G. *et al.* Effects, but no interactions, of ubiquitous pesticide and parasite stressors on honey bee (*Apis mellifera*) lifespan and behaviour in a colony environment. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4322–4331, nov. 2015.

ROBINSON, G. E. Regulation of Division of Labor in Insect Societies. **Annual Review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 637–665, jan. 1992.

ROLKE, D. *et al.* Large-scale monitoring of effects of clothianidin-dressed oilseed rape seeds on pollinating insects in Northern Germany: effects on honey bees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 9, p. 1648–1665, nov. 2016.

RORTAIS, A. *et al.* Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 71–83, jan. 2005.

ROSSI, C. DE A. *et al.* Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 76, n. 5, p. 552-8. 2013.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; BELZUNCES, L.; BONMATIN, J.-M. Lethal and sublethal effects, and incomplete clearance of ingested imidacloprid in honey bees (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, v. 26, n. 9, p. 1199–1206, nov. 2017.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees - A risk assessment. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

SANTOS, A. C. C. *et al.* *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera) in the target of neonicotinoids: A one-way ticket? Bioinsecticides can be an alternative. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 28–36, nov. 2018.

SCHMUCK, R. *et al.* Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, v. 57, n. 3, p. 225–238, mar. 2001.

SCHMUCK, R.; LEWIS, G. Review of field and monitoring studies investigating the role of nitro-substituted neonicotinoid insecticides in the reported losses of honey bee colonies (*Apis mellifera*). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 9, p. 1617–1629, 2016.

SEELEY, T. D. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 11, n. 4, p. 287–293, dez. 1982.

SIEDE, R. *et al.* A long-term field study on the effects of dietary exposure of clothianidin to varroosis-weakened honey bee colonies. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 772–783, 3 set. 2018.

SILCOX, C.; VITTUM, P. Turf insecticide classes and modes of action. **Golf Course Mgt.**, v. 76, n. 9, p. 82–90, 2008.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. *et al.* Structure and function of the intestine and Malpighian tubules: from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. In: **Biology to cell Marker Development for Toxicological Analysis**. Rio Claro: Nova Publi. 2010. p. 121–142.

SILVINA, N. *et al.* Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor. **Science of The Total Environment**, v. 581–582, p. 25–31, 1 mar. 2017.

SIMON-DELSO, N. *et al.* Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–16, 2014.

SIMON-DELSO, N. *et al.* Toxicity assessment on honey bee larvae of a repeated exposition of a systemic fungicide, boscalid. **Bulletin of Insectology**, v. 70, n. 1, p. 83–90, 2017.

ŠKERL, M. I. S. *et al.* Residues of Pesticides in Honeybee (*Apis mellifera carnica*) Bee Bread and in Pollen Loads from Treated Apple Orchards. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 3, p. 374–377, 12 set. 2009.

SMITH, M. L. The Honey Bee Parasite *Nosema ceranae*: Transmissible via Food Exchange? **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e43319, ago. 2012.

SPIVAK, M. *et al.* The Plight of the Bees †. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 1, p. 34–38, jan. 2011.

STERK, G. *et al.* Large-scale monitoring of effects of clothianidin-dressed OSR seeds on pollinating insects in Northern Germany: effects on large earth bumble bees (*Bombus terrestris*). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 9, p. 1666–1678, nov. 2016.

STOKSTAD, E. The Case of the Empty Hives. **Science**, v. 316, p. 970–973, 2007.

STONER, K. A.; EITZER, B. D. Movement of Soil-Applied Imidacloprid and Thiamethoxam into Nectar and Pollen of Squash (*Cucurbita pepo*). **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, e39114, 27 jun. 2012.

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, e3277, 2019.

TARNO, H.; WICAKSONO, K. P.; BEGLIOMINI, E. Floral Stimulation and Behavior of Insect Pollinators Affected by Pyraclostrobin on Arabica Coffee. **AGRIVITA Journal of Agricultural Science**, 2018.

TAVARES, D. A. *et al.* In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370–378, set. 2015.

TAVARES, D. A. *et al.* Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 386–393, 2017.

TAVARES, D. A. *et al.* 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.

TISON, L. *et al.* The neonicotinoid clothianidin impairs memory processing in honey bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 139–145, 30 set. 2019.

TOSI, S. *et al.* A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides. **Science of The Total Environment**, v. 615, p. 208–218, fev. 2018.

TRAVER, B. E. *et al.* Seasonal Effects and the Impact of In-Hive Pesticide Treatments on Parasite, Pathogens, and Health of Honey Bees. **Journal of Economic Entomology**, v. 111, n. 2, p. 517–527, 2018.

TRAVER, B. E.; FELL, R. D. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 3, p. 408–410, jul. 2012.

TSVETKOV, N. *et al.* Chronic exposure to neonicotinoids reduces honey bee health near corn crops. **Science**, v. 1397, p. 1395–1397, 2017.



UCHIGASHIMA, M. *et al.* Development of Immunoassay Based on Monoclonal Antibody Reacted with the Neonicotinoid Insecticides Clothianidin and Dinotefuran. **Sensors**, v. 12, n. 11, p. 15858–15872, nov. 2012.

UNDERWOOD, R.; VANENGELSDORP, D. Colony Collapse Disorder: Have we seen this before? **Bee Cult**, v. 35, p. 13–18, 2007.

UNEME, H. *et al.* Discovery and Development of a Novel Insecticide “Clothianidin”. **R&D Report**, v. 2, p. 1–15, 2006.

UNEME, H. Chemistry of Clothianidin and Related Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 7, p. 2932–2937, abr. 2011.

VANDAME, R.; PALACIO, M. A. Preserved honey bee health in Latin America: a fragile equilibrium due to low-intensity agriculture and beekeeping? **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 243–255, maio 2010.

VANENGELSDORP, D. *et al.* An Estimate of Managed Colony Losses in the Winter of 2006 – 2007: A Report Commissioned by the Apiary Inspectors of America. **American Bee Journal**, v. 147, n. 7, p. 599-603, 2007.

VANENGELSDORP, D. *et al.* A Survey of Honey Bee Colony Losses in the U.S., Fall 2007 to Spring 2008. **PLoS ONE**, v. 3, n. 12, e4071, dez. 2008.

VANENGELSDORP, D. *et al.* Colony collapse disorder: A descriptive study. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, 2009.

VANENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 80–95, 2009.

WANG, Y. *et al.* Comparison of the nutrient composition of royal jelly and worker jelly of honey bees (*Apis mellifera*). **Apidologie**, v. 47, n. 1, p. 48–56, 2016.

WINSTON, M. L. Desenvolvimento e nutrição. In: **A Biologia da Abelhas**. 1. ed. Porto Alegre: Magister. 2003. p. 53–80.

WU, J. Y.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (*Apis mellifera*) Development and Longevity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, e14720, fev. 2011.

YANG, E. C. *et al.* Impaired Olfactory Associative Behavior of Honeybee Workers Due to Contamination of Imidacloprid in the Larval Stage. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

ZALUSKI, R.; JUSTULIN, L. A.; ORSI, R. D. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.

ZEE, R. VAN DER *et al.* An Observational Study of Honey Bee Colony Winter Losses and Their Association with *Varroa destructor*, Neonicotinoids and Other Risk Factors. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, e0131611, jul. 2015.

ZHU, W. *et al.* Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

## APENDICE 1

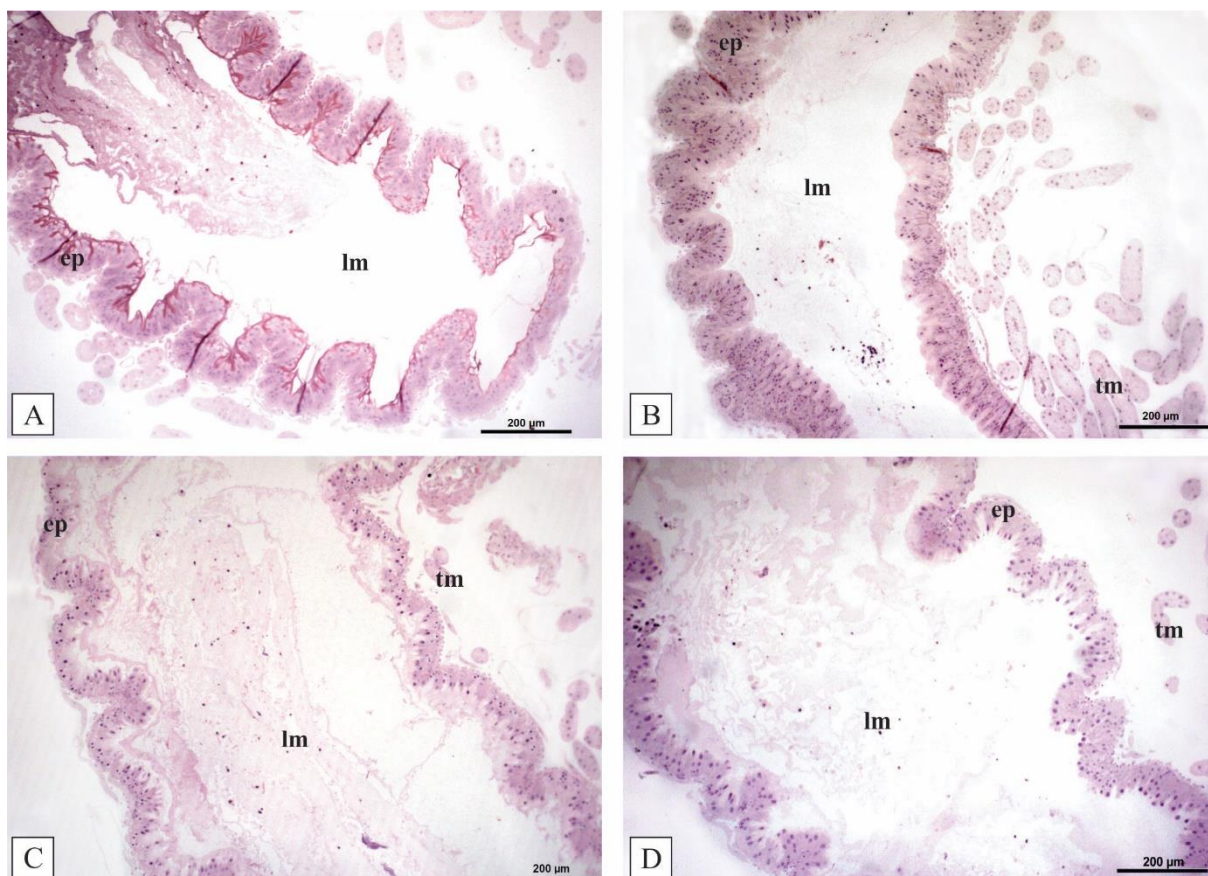
Tabela 2. Composição de dietas proteicas líquidas e sólidas para alimentação de abelhas adultas (V.p. – valor proteico; % m/m; xarope = solução açucarada à 50% m/m).

<b>Composição</b>	<b>Estado</b>	<b>V. p.</b>	<b>Observações</b>
23% de albumina; 65% de sacarose; 0,12% de água	Sólido	25%	Baixo consumo
13% de extrato de levedura; 0,05% de albumina; 69% de sacarose; 0,7% de água	Sólido	25%	Não houve consumo
18% de albumina; 8% de extrato de levedura; 63% de sacarose; 0,1% de água	Sólido	25%	Não houve consumo
37% de extrato levedura; 56% de sacarose; 0,7% de água	Sólido	25%	Não houve consumo
13,5% de extrato de levedura; 5% de albumina; 81,5% de água	Líquido	25%	Consumo médio, porém, aumentou a mortalidade
24% de extrato de levedura; 2% da mistura de aminoácidos; 74% de xarope	Líquido	25%	Baixo consumo
17% de extrato de levedura; 2% da mistura de aminoácidos; 81% de xarope	Líquido	12%	Apresentou o maior consumo entre as dietas
14% de extrato de levedura; 2% da mistura de aminoácidos; 84% de xarope	Líquido	9,3%	Consumo médio

\* Mistura de aminoácidos: suplemento animal - AMINOMIX®

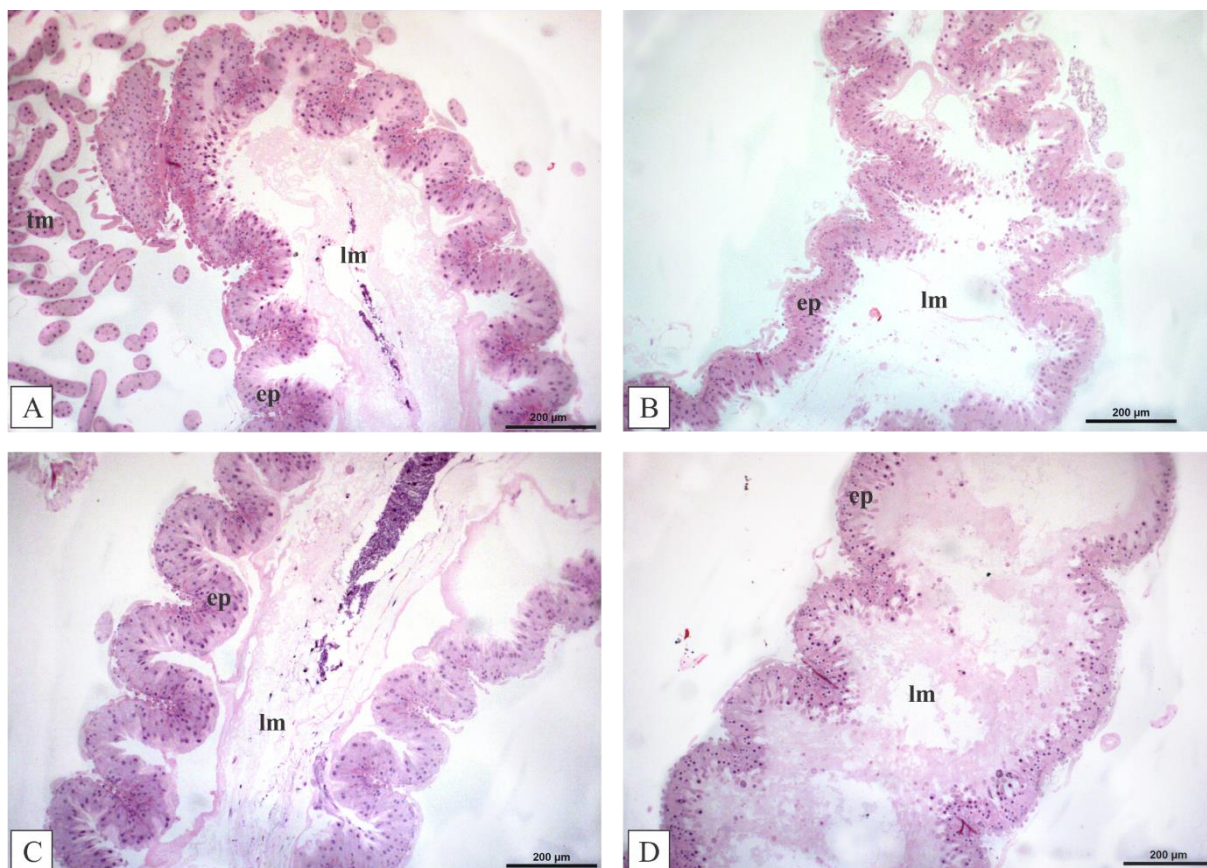
## APENDICE 2

FIGURA 22. Epitélio ventricular de abelhas adultas expostas à agrotóxicos durante à fase larval, H.E. A) Controle; B) Fungicida Piraclostrobina; C) Inseticida Clotianidina; D) Co-exposição (inseticida + fungicida). ep: epitélio ventricular; lm: lúmen; tm: túbulos de Malpighi.



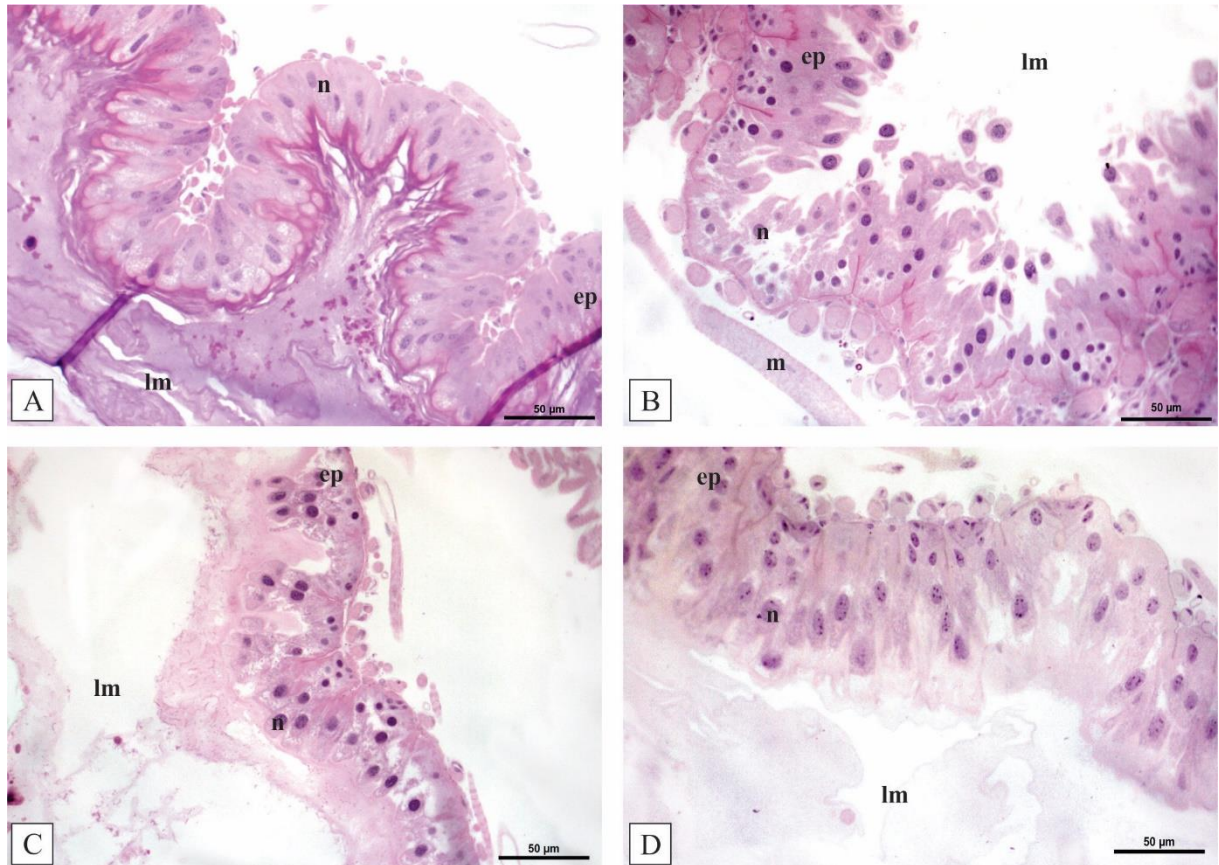
Fonte: Autoria própria.

FIGURA 23. Epitélio ventricular de abelhas adultas expostas à agrotóxicos durante à fase larval e infectadas com *Nosema ceranae* após a emergência, H.E. A) Controle; B) Fungicida Piraclostrobina; C) Inseticida Clotianidina; D) Co-exposição (inseticida + fungicida). ep: epitélio ventricular; lm: lúmen; tm: túbulo de Malpighi.



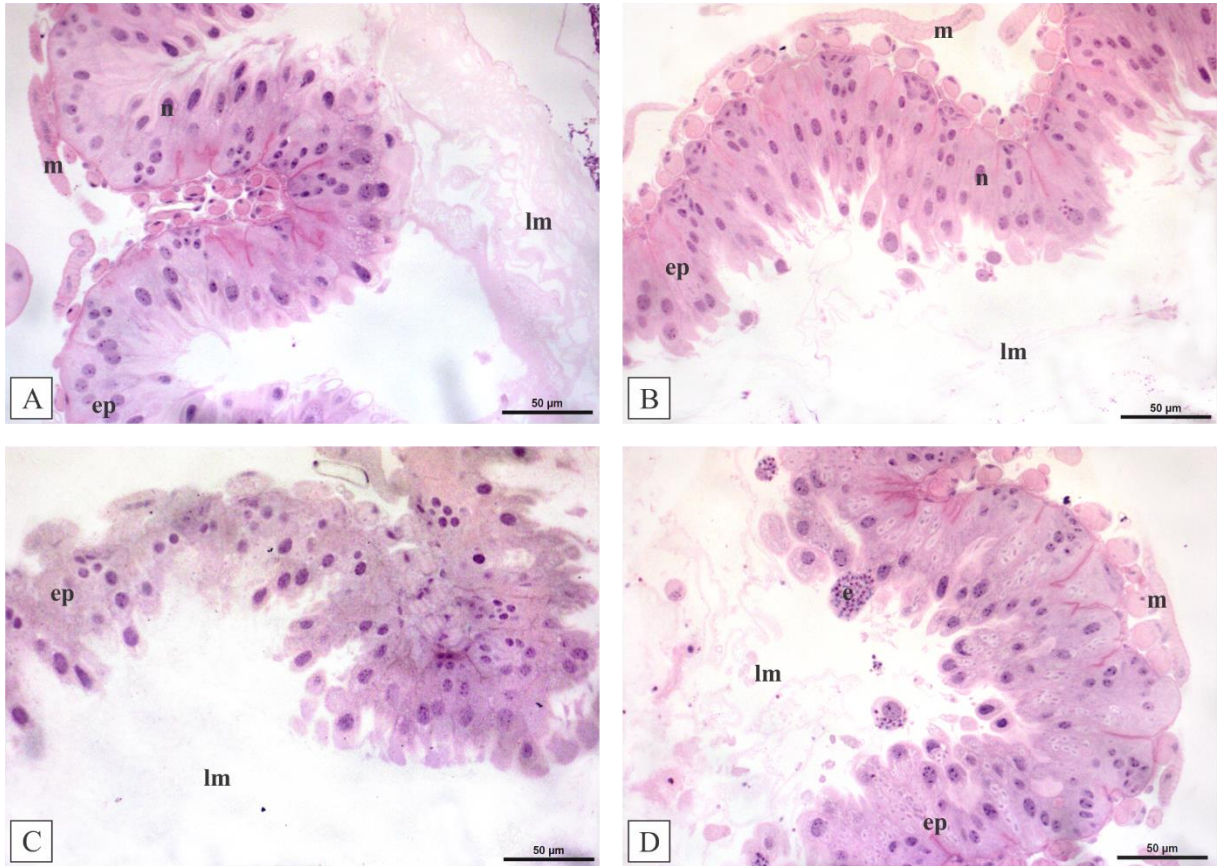
Fonte: Autoria própria.

FIGURA 24. Secção do epitélio ventricular de abelhas adultas expostas à agrotóxicos durante à fase larval. A) Controle; B) Fungicida Piraclostrobina; C) Inseticida Clotianidina; D) Co-exposição (inseticida + fungicida). ep: epitélio ventricular; lm: lúmen; n: núcleo; m: músculo.



Fonte: Autoria própria.

FIGURA 25. Secção do epitélio ventricular de abelhas adultas expostas à agrotóxicos durante à fase larval e infectadas com *Nosema ceranae* após a emergência. A) Controle; B) Fungicida Piraclostrobina; C) Inseticida Clotianidina; D) Co-exposição (inseticida + fungicida). ep: epitélio ventricular; lm: lúmen; tm: túbulo de Malpighi; n: núcleo; m: músculo; e: esporo de *Nosema ceranae*.



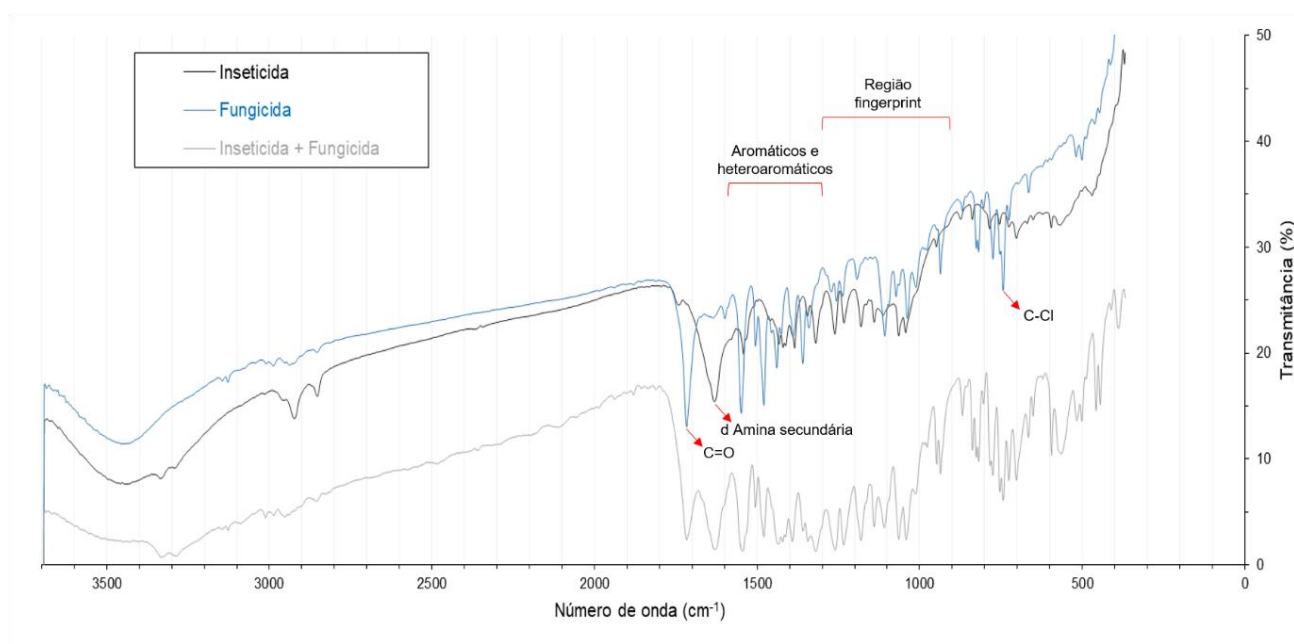
Fonte: Autoria própria.

### APENDICE 3

O inseticida clotianidina e o fungicida piraclostrobina foram caracterizados na forma pura e na forma combinada por espectroscopia FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) de forma a subsidiar a interpretação dos resultados. A leitura foi realizada pelo software OMNIC em uma pastilha de KBr na proporção 100:1 KBr/amostra.

A partir dessa análise, observou-se que a maioria das bandas presentes nos espectros dos agrotóxicos isolados apareceram na mistura dos dois agrotóxicos, algumas das bandas ausentes no espectro da combinação dos agrotóxicos podem ter sofrido sobreposição (Figura 28). Na região “fingerprint” do espectro ( $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ ), 63,6% das bandas foram iguais as observadas no fungicida piraclostrobina. As bandas presentes nos espectros na região  $1600\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  de intensidade forte e média indicam as estruturas aromáticas e heteroaromáticas dos compostos (LOPES; FASCIO, 2004; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

FIGURA 30. Espectro de FTIR do inseticida clotianidina e do fungicida piraclostrobina (d: dobramento).



Fonte: Autoria própria.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quim. Nova**, V. 27, 2004.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7 ed. 2005.



## ANEXOS

### ANEXO 1

#### **Protocolo Hematoxilina e eosina (H.E)**

Preparou-se a eosina amarelada 0,5% dissolvendo 2,5 gramas do corante em 500 mL de água destilada, após a homogeneização adicionou-se 1 mL de ácido acético glacial e homogenizou a solução. Antes do uso, a solução de eosina e de hematoxilina foram filtradas.

Os cortes foram hidratados por 10 minutos em água destilada, seguido da imersão em hematoxilina (formulação comercial) por 20 minutos. Os cortes foram lavados em água corrente e em seguida colocados na solução de eosina 0,5% por 2 minutos, seguida de lavagem em água destilada. Após os cortes secarem em temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com DPX-Mount.

### ANEXO 2

#### **Azul de Toluidina (1%)**

Para preparo da solução 2 g de Borato de sódio (Bórax) foi diluído sob agitação em 100 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 1 g do corante Azul de toluidina e homogenizada. Antes do uso, a solução foi filtrada.

Os cortes foram hidratados em água destilada por 10 minutos e em seguida secos parcialmente sobre um aquecedor de lâminas (28°C). Com a fonte de calor ainda ligada, os cortes foram cobertos com a solução de azul de toluidina por 1 minuto, lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com DPX-Mount.

### ANEXO 3

#### **Azul de Bromofenol**

Preparou a solução com 0,15 g de azul de bromofenol em 100 mL de solução aquosa de ácido acético 2% e 3g de bicloreto de mercúrio (HgCl<sub>2</sub>). O pH foi ajustado para 7,0 e a solução foi filtrada antes do uso.

Os cortes foram hidratados por 10 minutos em água destilada e imersos na solução de Azul de Bromofenol por 2 horas e 40 minutos. As lâminas foram lavadas por 5 minutos em fio de água corrente e secas em temperatura ambiente. Montou-se as lâminas com DPX-Mount. A técnica histoquímica de reação com Azul de Bromofenol consiste na detecção de proteínas totais por meio da coloração azul.

#### ANEXO 4

##### **Ácido Periódico de Schiff (PAS)**

A técnica histoquímica de reação com PAS consiste na detecção de glicoconjugados neutros (glicoproteínas, carboidratos, polissacarídeos neutros e ácidos) e glicogênio os quais são evidenciadas com coloração magenta. Os cortes foram hidratados por 10 minutos em água destilada, seguida de imersão em ácido periódico 0,4% por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em 3 banhos de água destilada de 3 minutos cada. Após as lâminas serem secas, estas foram imersas em Reativo de Schiff por 5 horas no escuro e em seguida lavadas em água corrente por 20 minutos. Após a secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com DPX-Mount.

#### ANEXO 5

##### **Sudam Black (1%)**

A solução do corante foi preparada pela diluição de 1g de Sudam black em um volume final de 100 mL de álcool etílico 70%. Após a homogeneização e filtragem, as lâminas previamente hidratadas por 10 minutos em água destilada, foram cobertas com a solução preparada por 5 minutos. Em seguida, foram lavadas até a remoção de todo excesso do corante. Após a secagem, as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.