

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

LETÍCIA ORSI

ANÁLISE DOS EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE A ESPÉCIE
***Scaptotrigona postica* Latreille, 1807**

ARARAS - SP

2020

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

LETÍCIA ORSI

ANÁLISE DOS EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE A ESPÉCIE
***Scaptotrigona postica* Latreille, 1807**

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

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

ARARAS - SP

2020

Orsi, Letícia

Análise dos efeitos de agrotóxicos sobre a espécie
Scaptotrigona postica Latreille, 1807 / Letícia Orsi --
2020.
58f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
Banca Examinadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli,
Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, Daiana Antonia
Tavares
Bibliografia

1. Alterações morfológicas em abelhas. 2. Exposição
aguda e crônica. 3. Inseticida e fungicida. I. Orsi, Letícia.
II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Letícia Orsi, realizada em 26/05/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Roberta Comélio Ferreira Nocelli (UFSCar)

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

Profa. Dra. Daiana Antonia Tavares (UNESP RC)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Roberta Nocelli, por toda paciência, compreensão, dedicação e ajuda para a realização deste trabalho.

À mestra Tatiane Grella, pela imensa ajuda, dedicação e paciência que teve comigo e com este trabalho.

À Profa. Dra. Elaine C. M. da Silva Zacarin, que foi minha orientadora durante a graduação e me ensinou a amar as abelhas.

À UFSCar e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, pela oportunidade de realização do mestrado. E também a todos os funcionários da instituição, que me ensinaram muito durante esse tempo.

Ao Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro, ao Centro de Estudos de Insetos Sociais e ao Prof. Dr. Osmar Malaspina por todo apoio fornecido.

À banca, pela disponibilidade e pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus colegas do grupo ASAs e LECA, principalmente à Isabella, pela ajuda, convivência e suporte que me forneceram nesse tempo de estudo.

Aos meus amigos, em especial, Julia, Jéssyca, Thais, Luiza e João Paulo, pelo companheirismo e por tornarem esse período de estudos muito mais leve e divertido.

À minha família: meus pais, Alvaro e Ivonete, minha irmã Mariana e minha tia Bete, que sempre confiaram em mim, apoiaram-me e me incentivaram a seguir meus sonhos. Vocês são tudo para mim!

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho. Toda ajuda foi muito bem-vinda e importante.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Portanto, agradeço à CAPES, pela concessão da bolsa de estudo, à FUNEP e à FAPESP (Proc. 2017/21097-3), que contribuíram financeiramente com o trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A polinização é um processo importante para a manutenção da biodiversidade, sendo que as abelhas são os principais polinizadores de grande parte dos ambientes naturais. Dentre as espécies encontradas no Brasil, está *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807, uma espécie com ferrão atrofiado, eussocial e pertencente à tribo Trigonini. Mesmo as abelhas sendo consideradas de extrema importância, algumas ações estão fazendo com que a população desses insetos diminua, como é o caso do uso inadequado de agrotóxicos. Este trabalho teve como objetivo expor as abelhas forrageiras, de forma oral, à concentrações subletais isoladas do inseticida dimetoato e do fungicida azoxistrobina (exposição aguda e crônica), e também avaliar e comparar as alterações morfológicas causadas no intestino médio e nos túbulos de Malpighi por ambos os tipos de exposições. As análises morfológicas foram feitas a partir de secções realizadas em micrótomo, em diferentes profundidades dos órgãos, as quais passaram por técnicas de dupla coloração por Hematoxilina e Eosina. As lâminas foram analisadas levando-se em consideração as seguintes alterações nos órgãos: perda de material citoplasmático, perda de borda em escova, eliminação de células para o lúmen, perda de ninhos de células regenerativas, inchaço celular, células com núcleos picnóticos, secreção apócrina e esferocristais. Para cada alteração observada, foi utilizado um valor de pontuação pré-estabelecido, que depende da intensidade da alteração no órgão. A partir dos resultados obtidos, foi observado que as exposições aguda e crônica às concentrações subletais dos agrotóxicos foram capazes de causar as alterações nos parâmetros citados, em ambos os órgãos, com exceção de secreção apócrina e esferocristais. Entretanto, a exposição crônica causou maiores prejuízos. Desta forma, conclui-se que tanto a exposição aguda quanto a crônica às concentrações subletais de dimetoato e azoxistrobina causam alterações morfológicas em importantes órgãos envolvidos na rota metabólica de agrotóxicos em *S. postica*.

Palavras-chave: dimetoato; azoxistrobina; intestino; túbulos de Malpighi; exposição aguda e crônica.

ABSTRACT

Pollination is an important process for maintaining biodiversity, and bees are the main pollinators of most natural environments. Among the species found in Brazil, is *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807, a species with stunted, eussocial and belonging to the Trigonini tribe. Even though bees are considered of extreme importance, some actions are causing the population of these insects to decrease, as is the case of the exaggerated and mistaken use of pesticides. This study aimed to expose forage bees, orally, to sublethal concentrations isolated from the insecticide dimethoate and the fungicide azoxystrobin (acute and chronic exposure), and also to evaluate and compare the morphological changes caused in the midgut and Malpighian tubules by both types of exposure. The morphological analyzes were made from sections carried out in microtome, in different depths of the organs, which underwent double staining techniques using Hematoxylin and Eosin. The slides were analyzed taking into account the following changes in the organs: loss of cytoplasmic material, loss of brush border, elimination of cells to the lumen, loss of regenerative cell nests, cell swelling, cells with pycnotic nuclei, apocrine secretion and spherocrystals. For each observed change, a pre-established score value was used, which depends on the intensity of the change in the organ. From the results obtained, it was observed that acute and chronic exposure to sublethal concentrations of pesticides were able to cause changes in the parameters mentioned, in both organs, with the exception of apocrine and spherocrystal secretion. Thus, it is concluded that acute and chronic exposure to sublethal concentrations of dimethoate and azoxystrobin cause morphological changes in important organs involved in the metabolic route of pesticides in *S. postica*.

Key-words: dimethoate, azoxyxtrobin, intestine, Malpighian tubules, acute and chronic exposure.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do padrão anatômico do sistema digestivo de abelhas adultas. Fonte: ilustração realizada por Elaine C. M. Silva-Zacarin e Bárbara N. Rodrigues (SILVA-ZACARIN et al., 2010)..... 5
- Figura 2.** Intestino de *Scaptotrigona postica* do grupo controle, onde pode ser observada a organização tecidual e dois dos três tipos celulares presentes: as células digestivas (CI) e as células regenerativas, nos ninhos (ncr); borda em escova (be); e L (lúmen). Coloração Hematoxilina e Eosina. Objetiva 40x. Fonte: elaborada pela autora. 6
- Figura 3.** Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* do grupo controle, onde pode ser observada a organização tecidual e algumas estruturas, como: células dos túbulos de Malpighi (CI); borda em escova (be); lúmen (L) e túbulos de Malpighi (TM). Coloração Hematoxilina e Eosina. Objetiva 40x. Fonte: elaborada pela autora. 7
- Figura 4.** Diluição seriada do inseticida dimetoato. Fonte: elaborada pela autora..... 10
- Figura 5.** Diluição seriada do fungicida azoxistrobina. Fonte: elaborada pela autora. 10
- Figura 6.** Intestino de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma aguda, ao dimetoato. Controle (A); CL_{50/100} por 1 dia (B); CL_{50/100} por 3 dias (C); CL_{50/100} por 5 dias (D); CL_{50/100} por 8 dias (E) e CL_{50/100} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCI), perda de ninhos de células regenerativas (pn-cr) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCI (círculo) e pic (asterisco). Fonte: elaborada pela autora. 34
- Figura 7.** Intestino de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma crônica, ao dimetoato. Controle (A); CL_{50/100} por 1 dia (B); CL_{50/100} por 3 dias (C); CL_{50/100} por 5 dias (D); CL_{50/100} por 8 dias (E) e CL_{50/100} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCI), perda de ninhos de células regenerativas (pn-cr) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCI (círculo) e pic (asterisco). Fonte: elaborada pela autora. 35
- Figura 8.** Túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma aguda, ao dimetoato. Controle (A); CL_{50/100} por 1 dia (B); CL_{50/100} por 3 dias (C); CL_{50/100}

por 5 dias (D); CL_{50/100} por 8 dias (E) e CL_{50/100} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), inchaço celular (ic) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo); pic (asterisco) e ic (quadrado). Fonte: elaborada pela autora..... 36

Figura 9. Túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma crônica, ao dimetoato. Controle (A); CL_{50/100} por 1 dia (B); CL_{50/100} por 3 dias (C); CL_{50/100} por 5 dias (D); CL_{50/100} por 8 dias (E) e CL_{50/100} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), inchaço celular (ic) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo); pic (asterisco) e ic (quadrado). Fonte: elaborada pela autora..... 37

Figura 10. Intestino de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma aguda, à azoxistrobina. Controle (A); C_{média} por 1 dia (B); C_{média} por 3 dias (C); C_{média} por 5 dias (D); C_{média} por 8 dias (E) e C_{média} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), perda de ninhos de células regenerativas (pnrc) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo) e pic (asterisco). Fonte: elaborada pela autora..... 38

Figura 11. Intestino de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma crônica, à azoxistrobina. Controle (A); C_{média} por 1 dia (B); C_{média} por 3 dias (C); C_{média} por 5 dias (D); C_{média} por 8 dias (E) e C_{média} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), perda de ninhos de células regenerativas (pnrc) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo) e pic (asterisco). Fonte: elaborada pela autora..... 39

Figura 12. Túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma aguda, à azoxistrobina. Controle (A); C_{média} por 1 dia (B); C_{média} por 3 dias (C); C_{média} por 5 dias (D); C_{média} por 8 dias (E) e C_{média} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), inchaço celular (ic) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo); pic (asterisco) e ic (quadrado). Fonte: elaborada pela autora..... 40

Figura 13. Túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma crônica, à azoxistrobina. Controle (A); C_{média} por 1 dia (B); C_{média} por 3 dias (C); C_{média} por 5 dias (D); C_{média} por 8 dias (E) e C_{média} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), inchaço celular (ic) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo); pic (asterisco) e ic (quadrado). Fonte: elaborada pela autora..... 41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Escore atribuído para as alterações no intestino (GRELLA et al., 2019).	13
Quadro 2. Escore atribuído para as alterações nos túbulos de Malpighi (GRELLA et al., 2019).	13
Quadro 3. Comparação da diferença estatística significativa entre os grupos controle e expostos ao inseticida dimetoato, com base nas alterações verificadas no intestino de <i>Scaptotrigona postica</i>	15
Quadro 4. Comparação da diferença estatística significativa entre os grupos controle e expostos ao inseticida dimetoato, com base nas alterações verificadas nos túbulos de Malpighi de <i>Scaptotrigona postica</i>	15
Quadro 5. Comparação da diferença estatística significativa entre os grupos controle e expostos ao fungicida azoxistrobina, com base nas alterações verificadas no intestino de <i>Scaptotrigona postica</i>	16
Quadro 6. Comparação da diferença estatística significativa entre os grupos controle e expostos ao fungicida azoxistrobina, com base nas alterações verificadas nos túbulos de Malpighi de <i>Scaptotrigona postica</i>	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise estatística das alterações morfológicas observadas no intestino de *Scaptotrigona postica* exposta ao dimetoato, de forma aguda e crônica. 42

Tabela 2. Análise estatística das alterações morfológicas observadas nos túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* exposta ao dimetoato, de forma aguda e crônica. 43

Tabela 3. Análise estatística das alterações morfológicas observadas no intestino de *Scaptotrigona postica* exposta à azoxistrobina, de forma aguda e crônica. 44

Tabela 4. Análise estatística das alterações morfológicas observadas nos túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* exposta à azoxistrobina, de forma aguda e crônica. 45

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO GERAL	8
Objetivos específicos	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
Material biológico	9
Grupos experimentais.....	9
Exposição ao inseticida dimetoato	9
Exposição ao fungicida azoxistrobina.....	10
Exposição aguda.....	10
Exposição crônica	11
Preparo e análise dos órgãos	11
Técnica de coloração por Hematoxilina e Eosina (Junqueira e Junqueira, 1983).....	11
Análise das lâminas histológicas.....	12
Atribuição dos valores de escore.....	12
Análise estatística.....	13
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
APÊNDICE 1 – FIGURAS	34
APÊNDICE 2 – TABELAS	42

INTRODUÇÃO

A polinização corresponde à transferência de pólen de anteras para os estigmas das flores, em uma mesma flor, em flores diferentes de uma mesma planta, ou flores localizadas em plantas diferentes e, por meio desse processo, os gametas dos vegetais são capazes de unirem-se na fertilização (KEVAN; VIANA, 2003). Esse processo pode acontecer por meio da ação de agentes polinizadores, que podem ser abióticos, como a água e o vento, ou bióticos, como insetos, aves e mamíferos (COSTA-MAIA; LINO-LOURENÇO; TOLEDO, 2010).

A polinização é apontada como um serviço ecossistêmico regulatório, de provisão e cultural, que fornece diversos benefícios aos seres humanos (BPBES/REBIPP, 2019). Alguns desses benefícios obtidos por meio da polinização são a manutenção da variabilidade genética de plantas nativas, o fornecimento de frutos, sementes e a capacidade de promover valores culturais relacionadas ao conhecimento tradicional (IPBES, 2016; COSTANZA et al., 2017). A polinização é um serviço ecossistêmico essencial para a manutenção de agro ecossistemas e atua de maneira eficaz na reprodução de plantas superiores e na conservação de ecossistemas, uma vez que mantém diversas interações entre plantas e animais (FREITAS; NUNES-SILVA, 2012).

A polinização como serviço ecossistêmico pode ser avaliada quando relacionada à produção de alimentos (BPBES/REBIPP, 2019). No Brasil, a polinização ligada à produção agrícola possui um valor anual estimado em US\$ 12 bilhões (GIANNINI et al., 2015). É importante ressaltar que 94% das plantas de ambientes tropicais são polinizadas por animais (OLLERTON et al., 2011).

O Brasil possui uma grande diversidade de animais que realizam o serviço de polinização. Essa riqueza relaciona-se a nove grupos de polinizadores, sendo que as abelhas correspondem à 66,3% das espécies polinizadoras, seguidas dos besouros (9,2%), borboletas (5,2%), mariposas (5,2%), aves (4,4%), vespas (4,4%), moscas (2,8%), morcegos (2%) e hemípteros (0,4%) (BPBES/REBIPP, 2019). Na agricultura, os polinizadores são responsáveis por polinizar 75% das plantas cultivadas, sendo que a falta desses animais pode diminuir a produtividade e a qualidade e, então, trazer prejuízos ao agricultor (MARQUES et al., 2015).

No Brasil, diversas culturas, como melão, melancia e soja dependem, em algum grau, da polinização (BPBES/REBIPP, 2019). As abelhas são consideradas eficientes agentes polinizadores devido a sua grande diversidade e a adaptação às estruturas florais,

como peças bucais e corpos adaptados para coletar néctar e pólen nas flores (KEVAN; BAKER, 1983).

Dentre as abelhas, há as que possuem ferrão atrofiado, uma vez que perderam a capacidade de ferroar ao longo do processo evolutivo (OLIVEIRA et al., 2013). Entretanto, possuem outros mecanismos de defesa de seus ninhos, como enrolar-se nos pelos ou beliscar a pele do agressor, por meio de suas mandíbulas (OLIVEIRA et al., 2013). A implementação de colônias de abelhas sem ferrão na agricultura tem tido resultado positivo na produtividade de certos cultivos (BPBES/REBIPP, 2019), pois são consideradas as principais polinizadoras de certas culturas, como melancia (*Citrullus lanatus* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), cebola (*Allium cepa* L.), café (*Coffea arabica* L.), entre outras (MACIEIRA; PRONI, 2004). Além disso, as abelhas também apresentam produtos e subprodutos de alto valor econômico, como cera, mel e própolis, que são alguns dos principais motivos para criação e manejo das abelhas sem ferrão (SILVA; PAZ, 2012).

As abelhas sem ferrão são divididas em duas tribos, de acordo com a classificação de Moure (1961): Meliponini e Trigonini. Dentro da tribo Trigonini, está a espécie *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (NOGUEIRA-NETO, 1997), utilizada no presente trabalho. A abelha *S. postica* possui comportamento classificado como eussocial, em que há sobreposição de gerações e divisão de tarefas entre os indivíduos da colônia (FERREIRA, 2010). A divisão de trabalho ocorre entre as fêmeas, sendo que a rainha é responsável por gerar novos indivíduos e as operárias possuem a função de manutenção e defesa da colônia (CRUZ-LANDIM; SANTOS, 2002). Já os machos possuem a função de acasalamento com as rainhas (NOGUEIRA-NETO, 1997) e também podem realizar trabalhos dentro da colônia, como defesa do ninho e incubação de favos de cria (KERR; CUNHA, 1990).

As abelhas são importantes polinizadores, mas, devido ao desmatamento de seus habitats, esses insetos têm intensificado o forrageamento em áreas agrícolas. Esse processo vem causando uma diminuição do número de abelhas, devido, dentre outros fatores, à exposição aos agrotóxicos utilizados para controlar pragas agrícolas nesses locais (MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006).

Os agrotóxicos estão relacionados à tecnologias referentes ao processo de desenvolvimento e modernização da agricultura, que aconteceu a partir dos anos 60 (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003). Segundo o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA), a agricultura brasileira fez o uso de 539,9 mil toneladas de agrotóxicos, em

2017. Uma das consequências ambientais preocupantes dos agrotóxicos é a contaminação de organismos não-alvo, como as abelhas (SAIBT, 2017). Segundo Lozowicka (2013), grande parte dos agrotóxicos é prejudicial para as abelhas, especialmente os inseticidas, que são mais prováveis de causar a morte desses animais.

Dentre os vários produtos utilizados para o controle de insetos-praga que ocorrem em áreas urbanas e na agricultura, há o dimetoato, um inseticida desenvolvido na década de 1950, pertencente ao grupo dos organofosforados (OMS, 2004; HEALTH CANADA, 2011). O dimetoato, no Brasil, é indicado para as culturas de citros, maçã, rosa, trigo, tomate e algodão (MAPA, 2017).

Os inseticidas da classe dos organofosforados atuam como inibidores da acetilcolinesterase, uma enzima que age na degradação de moléculas de acetilcolina após a transmissão de um impulso nervoso (MACEDO, 2016). Na presença do agrotóxico, a acetilcolina não é degradada e o impulso nervoso se torna contínuo. As consequências da contaminação por agrotóxicos da classe dos organofosforados podem ser tremores e convulsões, levando o sistema nervoso central ao colapso (YU et al., 2008).

O inseticida dimetoato foi utilizado no presente trabalho, pois, sua toxicidade e riscos são confirmados para abelhas da espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) e, em adição, após anos de estudos de toxicidade aguda, Gough, McIndoe e Lewis (1994) sugeriram que este inseticida fosse determinado como agrotóxico padrão em estudos de toxicidade. Agências reguladoras dos Estados Unidos da América, da Europa, do Brasil e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico indicam a utilização do dimetoato como padrão positivo em testes de toxicidade (MEDRZYCKI et al., 2013). Entretanto, há poucos dados sobre este inseticida para a espécie *S. postica* (MACEDO, 2016).

De acordo com o estudo de Lourencetti (2018), foi possível observar, por meio de concentração e dose letais médias (CL_{50} e DL_{50} , respectivamente), que as abelhas da espécie *S. postica* são mais susceptíveis ao inseticida dimetoato quando comparadas à espécie *A. mellifera*. Mesmo as abelhas não sendo consideradas organismos alvos do dimetoato, a semelhança fisiológica com os insetos-praga e o mecanismo de ação desse agrotóxico são determinantes na questão de elevada toxicidade em abelhas (SANCHEZ-BAYO et al., 2012).

Além dos inseticidas, os fungicidas representam outra classe de agrotóxicos que vem se destacando quanto aos efeitos causados em abelhas, uma vez que alguns trabalhos encontraram essa substância nas matrizes coletadas pelas abelhas. Como é o caso do

estudo realizado por Carneiro (2020), que demonstrou que abelhas da espécie *A. mellifera* podem ser prejudicadas pelo fungicida iprodione, uma vez que apresentaram alterações morfológicas nas células do intestino. Ademais, de acordo com Zaluski, Justulin e Orsi (2017), a exposição de abelhas nutrizas ao fungicida piraclostrobina, pertencente à classe das estrobilurinas, foi capaz de causar alterações danosas em suas glândulas mandibulares e hipofaríngeas, podendo prejudicar a manutenção da colônia por parte dessas abelhas.

Entre os fungicidas utilizados na agricultura, a classe dos benzimidazóis, triazóis e das estrobilurinas tem ganhado destaque nos últimos anos (SOARES et al., 2011). Entre o grupo das estrobilurinas, a azoxistrobina é um fungicida amplamente utilizado em cultivos agrícolas, sendo considerado muito perigoso ao meio ambiente (classe II) e altamente persistente (MAPA, 2019). É utilizado para controle de doenças, como a pinta-preta na batata, a ferrugem-do-cafeeiro no café, a mancha-preta de citros, o oídio no melão, a septoriose no tomate, entre outras (MAPA, 2019). Alguns dos motivos para a eficácia e o sucesso do grupo das estrobilurinas são sua atividade de amplo espectro, controle de fungos resistentes a outros mecanismos de ações de fungicidas, diminuição das taxas de uso e alto rendimento e qualidade (BARTLETT et al., 2002).

Quando as abelhas realizam o forrageamento em ambientes agrícolas, estão expostas a várias substâncias potencialmente tóxicas utilizadas no controle de pragas, como inseticidas, herbicidas e fungicidas (BAYO; GOKA, 2016). Quando se expõem a fungicidas, por exemplo, podem carregá-lo para dentro de suas colônias, o que pode comprometê-las como um todo, pois os fungos possuem alta relevância na manutenção de uma colônia saudável de abelhas (YODER et al., 2017). Em um estudo de Menezes et al. (2015) foi visto que a abelha nativa *Scaptotrigona aff. depilis* necessita, além de pólen e mel, de uma espécie de fungo para seu desenvolvimento. O consumo do fungo ocorre durante o período de desenvolvimento larval e fornece ergosterol para as abelhas, fazendo com que o desenvolvimento desses insetos seja bem sucedido (MENEZES et al., 2015; PALUDO et al., 2018).

Muitos agrotóxicos, incluindo os aqui mencionados, dimetoato e azoxistrobina, são sistêmicos, ou seja, são absorvidos pela planta e permanecem circulantes no sistema de vasos, podendo aparecer no pólen e no néctar, que são fontes de proteínas e carboidratos para as abelhas. Quando a exposição da abelha ao agrotóxico ocorre de forma oral, o primeiro órgão a entrar em contato com a substância química é o intestino (CATAE et al., 2014), que é um órgão importante para a análise de toxicidade, uma vez que possui como função a digestão e a absorção de nutrientes (CRUZ-LANDIM, 2009).

O sistema digestivo das abelhas é formado pelo canal alimentar que passa pelo corpo, longitudinalmente, da boca até o ânus (Figura 1). Dentro do sistema digestivo, há o intestino, que é dividido em três partes: intestino anterior, intestino médio ou ventrículo e intestino posterior (CHAPMAN, 1975). O intestino médio é a porção onde acontece a maior parte da digestão e absorção dos nutrientes (CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 1999).

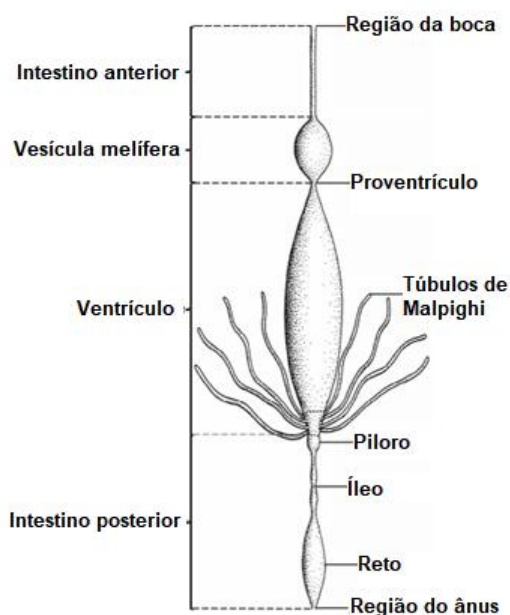


Figura 1. Representação esquemática do padrão anatômico do sistema digestivo de abelhas adultas. Fonte: ilustração realizada por Elaine C. M. Silva-Zacarin e Bárbara N. Rodrigues (SILVA-ZACARIN et al., 2010).

No epitélio intestinal das abelhas, são caracterizados três tipos celulares: células digestivas, regenerativas e endócrinas (SERRÃO, 1995 e 1996; CRUZ-LANDIM, 2009).

As células digestivas possuem a função de produzir enzimas digestivas e absorver nutrientes (CRUZ-LANDIM, 1985; SERRÃO, 1995). Quando essas células morrem, são substituídas pelas regenerativas, um grupo de células indiferenciadas que faz parte do ninho de células regenerativas (SILVA-ZACARIN et al., 2010), reparando assim, o número de células digestivas durante a vida do inseto (SERRÃO, 1996; CRUZ-LANDIM et al., 1996; CRUZ LANDIM; COSTA-LEONARDO, 1996) (Figura 2).

Além desses dois tipos de células mencionados acima, também estão presentes as endócrinas, que atuam na produção de diferentes peptídeos, que podem funcionar como hormônios no organismo (SILVA-ZACARIN et al., 2010). As células intestinais de abelhas sintetizam diversas enzimas que atuam no processo de desintoxicação,

fornecendo assim, maior tolerância aos xenobióticos, como agrotóxicos (SILVA-ZACARIN et al., 2010).



Figura 2. Intestino de *Scaptotrigona postica* do grupo controle, onde pode ser observada a organização tecidual e dois dos três tipos celulares presentes: as células digestivas (CI) e as células regenerativas, nos ninhos (ncr); borda em escova (be); e L (lúmen). Coloração Hematoxilina e Eosina. Objetiva 40x. Fonte: elaborada pela autora.

Após a passagem pelo intestino, o agrotóxico pode percorrer diferentes rotas, por exemplo, indo para a hemolinfa e chegando ao cérebro, mais rapidamente, ou passando pelos túbulos de Malpighi (Figura 3). Os túbulos de Malpighi são estruturas extensas e finas conectadas ao trato intestinal (NOCELLI et al., 2016). Em insetos, os túbulos de Malpighi são os principais órgãos excretores e osmorreguladores e, além da função de osmorregulação, também atuam na defesa do organismo, no transporte de substâncias orgânicas e na desintoxicação de substâncias químicas (NOCELLI et al., 2016).

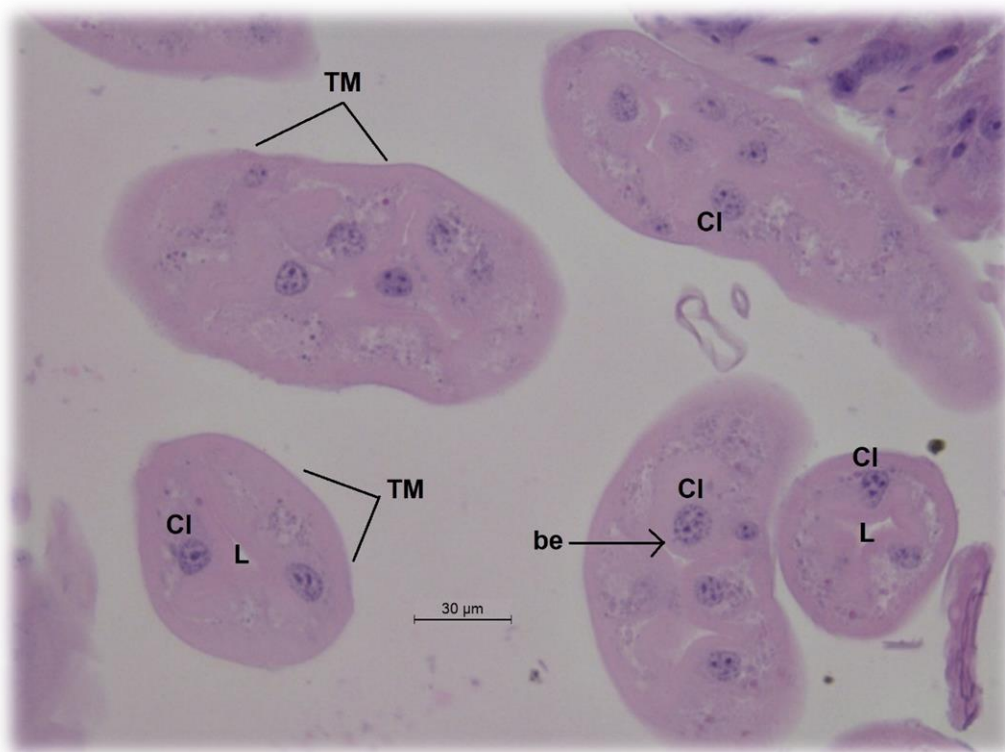


Figura 3. Fotomicrografia dos túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* do grupo controle, onde pode ser observada a organização tecidual e algumas estruturas, como: células dos túbulos de Malpighi (CI); borda em escova (be); lúmen (L) e túbulos de Malpighi (TM). Coloração Hematoxilina e Eosina. Objetiva 40x. Fonte: elaborada pela autora.

Alguns trabalhos apresentaram resultados que comprovaram que agrotóxicos podem causar danos celulares no intestino e nos túbulos de Malpighi das abelhas. Rossi et al. (2013) observaram aumento de células com núcleo picnótico e maior eliminação de células para o lúmen, quando abelhas da espécie *A. mellifera* foram expostas ao inseticida imidacloprido. Oliveira et al. (2013), por sua vez, verificaram perda de material citoplasmático em abelhas da espécie *A. mellifera* que foram expostas, oralmente, ao inseticida tiametoxam.

Em um trabalho realizado por Soares et al. (2015), foram observados diversos danos morfológicos, como perda de borda em escova, células com núcleo picnótico e inchaço celular em abelhas da espécie *S. postica* expostas ao inseticida imidacloprido. Além disso, no referido trabalho, também se verificou que as abelhas sem ferrão apresentaram maior sensibilidade ao inseticida imidacloprido, quando comparadas à espécie *A. mellifera*. Portanto, em estudos de toxicidade, o uso de mais espécies de abelhas deve ser adotado, devido ao fato de que uma única espécie não é capaz de representar todo o conjunto de diversidades fisiológicas e morfológicas (DECOURTYE et al., 2004).

Pequenas concentrações e doses de agrotóxicos podem não causar a morte imediata de abelhas, entretanto, podem interferir em seu comportamento, além de diminuir a atividade de forrageamento ou aumentar a desorientação desses insetos, prejudicando toda a colônia. Logo, alterações relevantes podem ser provocadas por essa exposição a longo prazo, mesmo à concentrações e doses baixas, conhecidas como subletais (NOCELLI et al., 2012).

A avaliação morfológica é de grande relevância no entendimento das alterações causadas pela exposição das abelhas aos agrotóxicos (MALASPINA & SILVA-ZACARIN, 2006). Em adição, os sistemas digestório e excretor, por possuírem ação na metabolização e eliminação de substâncias tóxicas ao organismo, são de grande importância e relevância para os estudos de toxicidade (SILVA-ZACARIN et al., 2010).

Considerando a importância das abelhas nativas para a polinização e a possível exposição desses insetos aos agrotóxicos, faz-se necessário o estudo dos efeitos dessas substâncias em polinizadores. Durante o forrageamento, as abelhas operárias podem ingerir resíduos de agrotóxicos, sendo que estes possuem potencial para comprometer a saúde e o comportamento do indivíduo e da colônia. Também é fundamental o estudo das consequências dos agrotóxicos a nível celular, uma vez que essas substâncias podem não causar a morte imediata da abelha, mas possuem potencial para prejudicar irreversivelmente seus órgãos envolvidos na rota metabólica.

OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos da exposição oral aguda e crônica a concentrações subletais do inseticida dimetoato e do fungicida azoxistrobina em abelhas forrageiras da espécie *S. postica*.

Objetivos específicos:

- 1- Analisar a morfologia do intestino e dos túbulos de Malpighi de *S. postica* após a exposição oral a concentrações subletais do inseticida dimetoato e do fungicida azoxistrobina.
- 2- Comparar, dentro de cada dia, os grupos expostos as concentrações subletais em relação ao controle.
- 3- Comparar, dentro de cada dia, o grupo exposto de forma aguda com o grupo exposto de forma crônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Foram coletadas abelhas forrageiras adultas de três colônias não-irmãs, da espécie *S. postica*. A coleta foi realizada na entrada das colônias, localizadas no meliponário do grupo de pesquisas sobre Abelhas e Serviços Ambientais (ASAs), da UFSCar-Araras. As abelhas foram mantidas em potes plásticos de 250 mL (10 abelhas por pote/concentração), previamente furados, para possibilitar a circulação de ar, e com suprimento de alimento (solução de sacarose 50% v/v). Os experimentos foram realizados em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O.) com temperatura a $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\%\pm 10\%$.

Grupos experimentais

Os grupos experimentais referentes ao inseticida dimetoato e ao fungicida azoxistrobina no presente trabalho foram: controle, exposição aguda e exposição crônica, para cada agrotóxico.

Para cada grupo experimental (controle, exposição aguda e exposição crônica), foram utilizados 3 potes plásticos, contendo 10 abelhas cada, logo, 90 abelhas foram necessárias para o experimento com o inseticida dimetoato e 90 para o experimento com o fungicida azoxistrobina. Vale ressaltar que esses 3 potes, por grupo, foram de colônias não-irmãs, para garantir a variabilidade genética.

Exposição ao inseticida dimetoato

O ingrediente ativo dimetoato, utilizado no experimento, foi obtido na Sigma-Aldrich (Brasil). Para a realização dos bioensaios, foi preparada uma solução mãe com 1000 ng/uL do ingrediente ativo, onde sucessivas diluições foram realizadas até obter-se a concentração desejada (Figura 4).

A concentração subletal utilizada no presente trabalho foi baseada no trabalho de iniciação científica da Ana Paula Salomé Lourencetti (PIBIC edital 2017/2018), intitulado: “Determinação da Dose Letal Média (DL_{50}) e da Concentração Letal Média (CL_{50}) do fungicida azoxistrobina para abelhas da espécie *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1804)”, o qual estabeleceu a CL_{50} do dimetoato, que foi de 4,392 ng/ μL . Para simular o resíduo do inseticida encontrado no campo, a dose utilizada no presente trabalho foi dividida por 100 ($CL_{50/100}$): 0,04392 ng/ μL .

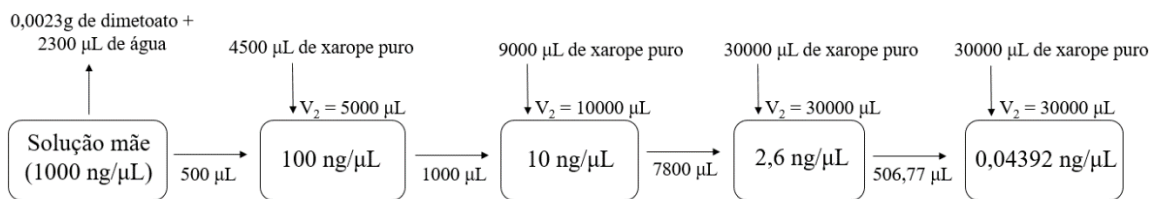


Figura 4. Diluição seriada do inseticida dimetoato. Fonte: elaborada pela autora.

Exposição ao fungicida azoxistrobina

O ingrediente ativo azoxistrobina (pureza 98%), utilizado no experimento, foi obtido na Sigma-Aldrich (Brasil). Para a realização dos bioensaios, foi preparada uma solução mãe com 10000 ng/μL do ingrediente ativo, onde sucessivas diluições foram realizadas até obter-se a concentração desejada (Figura 5).

A concentração subletal utilizada no presente trabalho foi baseada no dado obtido por meio do trabalho Pettis et al. (2013), onde foi descrita a concentração média do fungicida azoxistrobina encontrada no pólen de abelhas forrageiras: 0,060 ng/μL. Como esse dado encontrado no estudo de Pettis et al. (2013) já é referente ao resíduo encontrado em campo, a concentração utilizada para azoxistrobina neste trabalho não precisou ser dividida por 100 e foi denominada de concentração média (Cmédia).

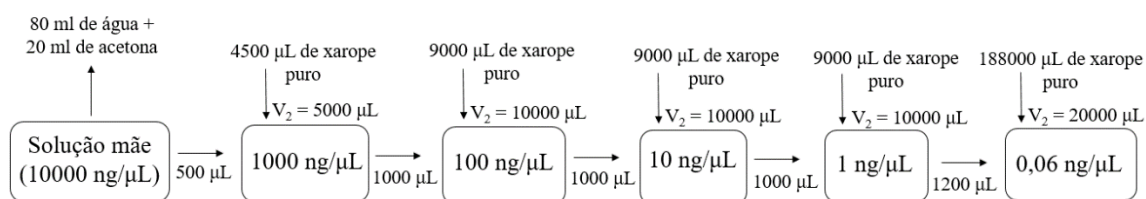


Figura 5. Diluição seriada do fungicida azoxistrobina. Fonte: elaborada pela autora.

Exposição aguda

Na exposição aguda, as abelhas foram expostas ao alimento contaminado com agrotóxico durante 24 horas e, em seguida, o alimento foi substituído por xarope puro (solução de sacarose 50% v/v), durante os 9 dias de experimento restantes. A concentração utilizada de dimetoato foi de 0,04392 ng/μL e de azoxistrobina, 0,060 ng/μL. O alimento com o agrotóxico foi fornecido apenas uma vez, durante essas 24

horas, *ad libitum* e, após esse período, a dieta das abelhas se manteve apenas com xarope, sendo adicionado quando necessário.

Exposição crônica

Já na exposição crônica, as abelhas foram expostas ao alimento contaminado com o agrotóxico durante os 10 dias de experimento, *ad libitum*. A concentração utilizada de dimetoato foi de 0,04392 ng/ μ L e de azoxistrobina foi de 0,060 ng/ μ L. A cascata foi realizada levando em consideração que o alimento contendo o agrotóxico deveria durar, pelo menos, 10 dias. E esse alimento que continha o agrotóxico foi sendo acrescentado, quando necessário, para que as abelhas o tivessem em abundância.

Preparo e análise dos órgãos

Os tempos de dissecação dos órgãos foram escolhidos baseados nos resultados encontrados por Catae et al. (2014), e adicionado o 10º dia, uma vez que os autores do referido trabalho observaram apenas a recuperação do intestino e não nos túbulos de Malpighi até o 8º dia de análise.

Para cada grupo/tempo do bioensaio, foram dissecadas 4 abelhas. Após a dissecação, os órgãos retirados foram fixados em paraformaldeído 4% por 48 horas e, em seguida, o paraformaldeído foi substituído por tampão fosfato de sódio, no qual os órgãos ficaram por 72 horas. Na sequência, seguiu-se o protocolo de desidratação lenta dos órgãos para inclusão em historesina Leica (SILVA-ZACARIN et al., 2012). As análises morfológicas foram feitas a partir de secções com espessura de 6 μ m realizadas em micrótomo (Leica), em diferentes profundidades dos órgãos, que foram colocados em lâminas histológicas, as quais passaram por técnicas de dupla coloração conforme descrito abaixo.

Técnica de coloração por Hematoxilina e Eosina (Junqueira e Junqueira, 1983)

De acordo com o protocolo estabelecido por Junqueira e Junqueira (1983), primeiramente, as lâminas foram colocadas em água destilada durante 1 minuto. Posteriormente, foram coradas com hematoxilina por 10 minutos, lavadas novamente em água destilada por 5 minutos e, então, imersas em água corrente por 1 minuto. Após esse processo, as lâminas foram coradas com eosina aquosa durante 5 minutos e lavadas em água corrente por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram secas e montadas com a utilização de DPX, um meio de montagem permanente. Os cortes foram analisados e

fotografados por meio de um fotomicroscópio de luz Leica e software LAS V4.4 para a captura das imagens.

Análise das lâminas histológicas

As imagens capturadas pelo fotomicroscópio de luz Leica foram em aumento final de 400x e as análises das alterações morfológicas foram realizadas por meio do programa ImageJ. Foram analisadas 9 fotos por dia, para cada órgão e agrotóxico. Por exemplo, para o intestino de abelhas expostas ao dimetoato, foram analisadas 9 fotos (3 do grupo controle; 3 do grupo exposto de forma aguda e 3 do grupo exposto de forma crônica), em cada um dos 5 dias de coleta (1, 3, 5, 8 e 10) dos órgãos. Logo, ao considerar o intestino exposto ao dimetoato, foram analisadas 45 imagens (9 fotos para cada um dos 5 dias de coleta dos órgãos). O mesmo vale para o intestino exposto a azoxistrobina (45 fotos), para os túbulos de Malpighi expostos ao inseticida (45 fotos) e para os túbulos de Malpighi expostos ao fungicida (45 fotos). Então, no total, foram analisadas 180 fotos.

Em cada uma das fotos analisadas, foram realizadas 3 medições de uma determinada alteração morfológica, dessa forma, foram obtidas 540 medidas (180 fotos x 3 medições). Eliminação de células, picnose e perda de ninhos de células regenerativas foram analisadas por meio de contagens das células afetadas em relação ao número total de células na imagem, e os dados foram gerados em porcentagem. Perda de material citoplasmático, borda em escova e inchaço celular foram analisados por meio de medidas, as quais foram realizadas em 3 regiões distintas da mesma imagem. Secreção apócrina e esferocristais foram analisados mediante ao contraste de imagem, realizados em 3 regiões distintas da imagem.

Atribuição dos valores de score

Após a análise das imagens, seguiu-se o método descrito por Grella et al. (2019), no qual os valores obtidos foram analisados de acordo com os escores e as frequências descritas. Os dados obtidos proporcionaram uma análise semiquantitativa e, então, foram capazes de indicar o nível de toxicidade e a significância da exposição dos órgãos aos agrotóxicos.

Os passos realizados para obter os dados utilizados na análise estatística, de acordo com Grella et al. (2019), foram:

- 1) A substituição de cada valor obtido no programa ImageJ pela frequência de ocorrência do dano (que pode ser 0, 2, 4 ou 6) de acordo com a intensidade na qual ela se encaixa.

- 2) A multiplicação da frequência de ocorrência do dano pelo valor do escore da alteração. O escore pode ser de grau 1, 2 ou 3 (Quadros 1 e 2), sendo que o grau 1 corresponde a uma lesão patológica menor e reversível; o grau 2 está relacionado a uma lesão moderada e, geralmente, reversível; e o grau 3 representa uma lesão grave e irreversível, que pode comprometer todo órgão em análise.
- 3) O valor final da multiplicação foi utilizado na análise estatística.

Quadro 1. Escore atribuído para as alterações no intestino (GRELLA et al., 2019).

ALTERAÇÕES NO INTESTINO	ESCORE
Secreção apócrina	1
Esferocristais	1
Eliminação de células para o lúmen	1
Vacuolização / Perda de material citoplasmático	2
Perda de borda em escova	2
Perda de ninhos de células regenerativas	3
Células com picnose / condensação cromatínica	3

Quadro 2. Escore atribuído para as alterações nos túbulos de Malpighi (GRELLA et al., 2019).

ALTERAÇÕES NOS TÚBULOS DE MALPIGHI	ESCORE
Secreção apócrina	1
Esferocristais	1
Eliminação de células para o lúmen	1
Vacuolização / Perda de material citoplasmático	2
Perda de borda em escova	2
Inchaço celular / redução do lúmen	2
Células com picnose / condensação cromatínica	3

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado no presente trabalho foi de blocos casualizados, onde cada bloco demonstrava um tratamento em que a abelha foi submetida.

Devido à utilização do escore (GRELLA et al., 2019), que é uma atribuição de valores pré-determinados, os dados foram considerados não-paramétricos, por não possuírem distribuição normal (TRIOLA, 2008). Os valores obtidos após o cálculo da multiplicação do escore pela frequência de ocorrência das alterações foram submetidos a análise estatística comparativa, com a utilização do teste de Friedman, que está incluído no pacote “agricolae” (MENDIBURU, 2019), no software RStudio (R CORE TEAM, 2018).

As análises estatísticas foram feitas a partir de três linhas de comparação, dentro de cada dia de coleta dos órgãos (1, 3, 5, 8 e 10 dias): comparação entre o grupo controle e o exposto, de forma aguda, ao agrotóxico; comparação entre o grupo controle e o exposto, de forma crônica, ao agrotóxico; e comparação entre os grupos expostos agudamente e cronicamente ao agrotóxico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, observou-se que a exposição oral aguda e crônica à concentrações subletais de dimetoato e de azoxistrobina foi capaz de causar alterações morfológicas no intestino e nos túbulos de Malpighi da abelha *S. postica* como demonstrado nos quadros a seguir. Como apêndice, ao final do trabalho, encontram-se disponíveis as Tabelas (1, 2, 3 e 4) com os valores completos relacionados às alterações morfológicas observadas no intestino e nos túbulos de Malpighi de *S. postica* exposta aos agrotóxicos. Além disso, também são apresentadas, em apêndice, as Figuras (6 a 13) que demonstram os danos morfológicos encontrados nos órgãos analisados de *S. postica*, após a exposição aguda e crônica. Já os quadros a seguir correspondem a um resumo dos resultados obtidos, com o objetivo de facilitar a compreensão do leitor do trabalho.

Uma alteração morfológica observada, após a exposição de ambos os órgãos aos dois agrotóxicos, foi a perda de material citoplasmático (Quadros 3, 4, 5 e 6 e Tabelas 1, 2, 3 e 4). A perda de material citoplasmático é um processo que ocorre naturalmente, entretanto, a degradação de algumas áreas do citoplasma pode indicar morte celular, o que é capaz de prejudicar o funcionamento do órgão (MOORE; ALLEN; SOMERFIELD, 2006).

No intestino, quando comparou-se o grupo controle e o exposto ao dimetoato de forma aguda observou-se que, em relação à perda de material citoplasmático (Figura 6), ocorreu diferença estatística entre os grupos nos dias 1, 3 e 8 de análise, sendo que o

grupo exposto apresentou maior intensidade de alteração. Já ao considerar o grupo controle e o exposto ao inseticida de forma crônica (Figura 7) verificou-se que, em relação à mesma alteração, o grupo exposto demonstrou intensidade maior em todos os dias de análise. A partir desse fato, podemos inferir que a exposição crônica foi mais prejudicial para essa alteração no intestino, uma vez que intensificou a perda de material citoplasmático em todos os dias de análise. Isto ocorreu, provavelmente pelo fato de que, na exposição crônica, a abelha recebeu alimentação com o dimetoato em todos os dias de experimento.

Quadro 3. Comparação da diferença estatística significativa entre os grupos controle e expostos ao inseticida dimetoato, com base nas alterações verificadas no intestino de *Scaptotrigona postica*.

	1 dia			3 dias			5 dias			8 dias			10 dias		
	Da	Dc	D	Da	Dc	D	Da	Dc	D	Da	Dc	D	Da	Dc	D
pmc	✓	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-	✓	✓	-	-	✓	-
pbe	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	-	-	-
eCl	-	-	-	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pic	-	-	-	-	✓	Dc >	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Grupo exposto ao dimetoato, de forma aguda, comparado ao controle (Da); grupo exposto ao dimetoato, de forma crônica, comparado ao controle (Dc); comparação entre os grupos expostos ao dimetoato de forma aguda e crônica (D); perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe); eliminação de células para o lúmen (eCl) e picnose (pic). O símbolo de “check” (✓) indica que houve diferença estatística no respectivo grupo, comparado ao controle. O símbolo de maior (>), presente na comparação entre os grupos expostos ao dimetoato (D), indica se o valor de alteração foi mais alto na exposição aguda ou crônica e também que ocorreu diferença estatística na comparação entre as duas formas de exposição.

Nos túbulos de Malpighi, quando comparou-se o grupo controle e os expostos ao dimetoato, de forma aguda (Figura 8) e crônica (Figura 9), foi possível observar que os grupos expostos apresentou maior frequência de perda de material citoplasmático nos dias 1, 5, 8 e 10 de análise. Vale ressaltar que, de acordo com a comparação realizada entre os grupos expostos, de forma aguda e crônica ao dimetoato, observou-se que, no oitavo dia de análise, o grupo exposto de forma crônica demonstrou maior frequência de perda de material citoplasmático.

Quadro 4. Comparação da diferença estatística significativa entre os grupos controle e expostos ao inseticida dimetoato, com base nas alterações verificadas nos túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica*.

	1 dia			3 dias			5 dias			8 dias			10 dias		
	Da	Dc	D	Da	Dc	D	Da	Dc	D	Da	Dc	D	Da	Dc	D
pmc	✓	✓	-	-	-	-	✓	✓	-	✓	✓	Dc >	✓	✓	-
pbe	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	Da >	✓	✓	Da >
eCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	✓	-	-	-	-

Grupo exposto ao dimetoato, de forma aguda, comparado ao controle (Da); grupo exposto ao dimetoato, de forma crônica, comparado ao controle (Dc); comparação entre os grupos expostos ao dimetoato de forma aguda e crônica (D); perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe) e eliminação de células para o lúmen (eCl). O símbolo de “check” (✓) indica que houve diferença estatística no respectivo grupo, comparado ao controle. O símbolo de maior (>), presente na comparação entre os grupos expostos ao dimetoato (D), indica se o valor de alteração foi mais alto na exposição aguda ou crônica e também que ocorreu diferença estatística na comparação entre as duas formas de exposição.

No intestino, quando se comparou o grupo controle ao exposto a azoxistrobina de forma aguda (Figura 10), observou-se que, em relação à alteração perda de material citoplasmático, o grupo exposto apresentou maior ocorrência de alteração nos dias 3 e 5 de análise. Já quando foram comparados o grupo controle e o exposto a azoxistrobina de forma crônica (Figura 11) verificou-se que o grupo exposto demonstrou maior frequência de perda de material citoplasmático nos dias 3, 5, 8 e 10 de análise.

Além disso, ao comparar os grupos expostos a azoxistrobina, de forma aguda e crônica, o grupo exposto cronicamente apresentou maior frequência de perda de material citoplasmático nos dias 3, 5, 8 e 10 de análise. Este fato demonstra que, no primeiro dia de análise, nem a exposição aguda nem a crônica interferiram no intestino, em relação a essa alteração. Entretanto, a partir do terceiro dia de análise, o grupo exposto de forma crônica demonstrou maior intensidade de alteração, provavelmente pelo tempo de exposição ter sido maior.

Quadro 5. Comparação da diferença estatística significativa entre os grupos controle e expostos ao fungicida azoxistrobina, com base nas alterações verificadas no intestino de *Scaptotrigona postica*.

	1 dia			3 dias			5 dias			8 dias			10 dias		
	Aa	Ac	A	Aa	Ac	A	Aa	Ac	A	Aa	Ac	A	Aa	Ac	A
pmc	-	-	-	✓	✓	Ac>	✓	✓	Ac>	-	✓	Ac>	-	✓	Ac>
pbe	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-
eCl	-	-	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pncr	✓	✓	-	-	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pic	-	-	-	-	✓	Ac>	-	✓	Ac>	-	-	-	-	✓	Ac>

Grupo exposto a azoxistrobina, de forma aguda, comparado ao controle (Aa); grupo exposto a azoxistrobina, de forma crônica, comparado ao controle (Ac); comparação entre os grupos expostos a azoxistrobina de forma aguda e crônica (D); perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe); eliminação de células para o lúmen (eCl); perda de ninhos de células regenerativas (pncr) e picnose (pic). O símbolo de “check” (✓) indica que houve diferença estatística no respectivo grupo, comparado ao controle. O símbolo de maior (>), presente na comparação entre os grupos expostos a azoxistrobina (A), indica se o valor de alteração foi mais alto na exposição aguda ou crônica e também que ocorreu diferença estatística na comparação entre as duas formas de exposição.

Nos túbulos de Malpighi, a comparação entre o grupo controle e o exposto de forma aguda a azoxistrobina (Figura 12) mostrou que, em relação a perda de material

citoplasmático, o grupo exposto apresentou maior intensidade de alteração apenas no terceiro dia de análise. Já quando comparamos o grupo controle e o exposto de forma crônica a azoxistrobina (Figura 13), verificou-se que o grupo exposto demonstrou maior frequência de alteração nos dias 3, 5, 8 e 10 de análise. Vale ressaltar que, quando foram comparados os grupos expostos a azoxistrobina, de forma aguda e crônica, observou-se que o grupo exposto de forma crônica apresentou maior incidência de perda de material citoplasmático nos dias 5, 8 e 10 de análise.

Quadro 6. Comparação da diferença estatística significativa entre os grupos controle e expostos ao fungicida azoxistrobina, com base nas alterações verificadas nos túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica*.

	1 dia			3 dias			5 dias			8 dias			10 dias		
	Aa	Ac	A	Aa	Ac	A	Aa	Ac	A	Aa	Ac	A	Aa	Ac	A
pmc	-	-	-	✓	✓	-	-	✓	Ac >	-	✓	Ac >	-	✓	Ac >
pbe	✓	✓	-	✓	✓	Ac >	✓	✓	-	✓	✓	-	✓	✓	-
eCl	-	-	-	-	-	-	✓	✓	-	-	-	-	-	-	-

Grupo exposto a azoxistrobina, de forma aguda, comparado ao controle (Aa); grupo exposto a azoxistrobina, de forma crônica, comparado ao controle (Ac); comparação entre os grupos expostos a azoxistrobina de forma aguda e crônica (D); perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe) e eliminação de células para o lúmen (eCl). O símbolo de “check” (✓) indica que houve diferença estatística no respectivo grupo, comparado ao controle. O símbolo de maior (>), presente na comparação entre os grupos expostos a azoxistrobina (A), indica se o valor de alteração foi mais alto na exposição aguda ou crônica e também que ocorreu diferença estatística na comparação entre as duas formas de exposição.

A partir dos dados apresentados pode-se inferir que, assim como no intestino, no primeiro dia de análise, nem a exposição aguda nem a crônica interferiram nos túbulos de Malpighi em relação à perda de material citoplasmático. Porém, nos dias 5, 8 e 10 a exposição crônica se mostrou mais prejudicial, talvez devido ao tempo maior em que a abelha recebeu alimentação com o fungicida.

Catae et al. (2014), em seu trabalho, observou a recuperação do intestino, a partir do 3º dia, após a exposição da abelha *A. mellifera* a concentração subletal do inseticida tiametoxam, entretanto, nos túbulos de Malpighi não foi vista essa recuperação do órgão. No presente estudo, verificou-se que, em relação a exposição aguda ao inseticida dimetoato, pode ter ocorrido recuperação, uma vez que o grupo exposto diferiu do controle nos dias 1, 3 e 8 de análise, ou seja, no quinto dia não ocorreu diferença estatística, o que demonstra que o órgão poderia estar realizando a desintoxicação e, no décimo dia também não houve diferença, outro indício de que poderia estar ocorrendo a metabolização do dimetoato. Já quando consideramos a exposição crônica ao inseticida,

não foi possível observar recuperação do intestino ou dos túbulos de Malpighi de *S. postica*.

Sobre a exposição aguda ao fungicida azoxistrobina, foi observada uma possível recuperação de ambos os órgãos, o que pode ser explicado pelo fato de as abelhas terem sido expostas apenas por 1 dia ao fungicida e, provavelmente, isso auxiliou na desintoxicação e recuperação do órgão. Já na exposição crônica não se verificou recuperação dos órgãos analisados, pois a abelha alimentou-se com a azoxistrobina durante todos os dias de experimento, e então, a recuperação dos órgãos pode ter sido dificultada, devido ao tempo longo de exposição. Segundo Grella et al. (2019), o dano perda de material citoplasmático é moderadamente prejudicial e reversível.

A partir dos resultados observados, foi vista a recuperação dos órgãos de *S. postica* após a exposição aguda ao fungicida azoxistrobina, em relação a perda de material citoplasmático. No intestino, verificou-se que a partir do 8º dia de análise, não ocorreu diferença entre o grupo exposto agudamente e o controle. Já nos túbulos de Malpighi, a partir do 5º dia de análise não foi observada diferença estatística entre o grupo exposto e o controle. Portanto, devido a esse fato, pode-se inferir que há a possibilidade do intestino e dos túbulos de Malpighi terem conseguido se recuperar, em relação a alteração perda de material citoplasmático, do fungicida, após a exposição aguda.

Existem dados na literatura que também encontraram perda de material citoplasmático nos órgãos de abelhas expostas a agrotóxicos. No estudo realizado por Carneiro et al. (2020), que utilizou a microscopia eletrônica, foi observada perda de material citoplasmático no intestino de abelhas da espécie *A. mellifera* expostas ao fungicida iprodione, durante 24 horas. O aumento de vacuolização do citoplasma causado pelos agrotóxicos pode ter ocorrido devido a degeneração de organelas, por exemplo, o retículo endoplasmático, como verificado em outros insetos que foram expostos a agentes estressores (ROST-ROSZKOWKA et al., 2008; AKI, NARA, UEMARA, 2012).

O trabalho efetuado por Rossi (2011) também demonstrou que abelhas *A. mellifera*, expostas durante 10 dias a doses subletais do inseticida imidacloprido, apresentaram perda de material citoplasmático no intestino e nos túbulos de Malpighi. Ademais, Rossi (2011) observou que, quando a dose letal média foi dividida por 100 (DL_{50/100}), a perda de material citoplasmático iniciou-se no terceiro dia de análise, sendo que este mesmo fato ocorreu no presente trabalho, quando os túbulos de Malpighi de *S. postica* foram expostos ao fungicida azoxistrobina, uma vez que houve diferença estatística entre os grupos a partir do terceiro dia de análise.

Outra alteração constatada foi a perda de borda em escova (Quadros 3, 4, 5 e 6 e Tabelas 1, 2, 3 e 4). A borda em escova possui como função principal a absorção de nutrientes, uma vez que está em contato direto com o alimento e com as células digestivas, que também possuem a função absorptiva (CRUZ-LANDIM, 2009). Logo, a perda de borda em escova pode comprometer a absorção de nutrientes por parte desses insetos, prejudicando assim, o funcionamento do organismo.

No presente trabalho, quando comparamos o intestino do grupo controle ao grupo exposto ao dimetoato de forma aguda (Figura 4) e crônica (Figura 5), em relação a perda de borda em escova, foi possível observar que os grupos expostos apresentaram maior frequência de alteração nos dias 1, 3, 5 e 8 de análise. Essa alteração também foi observada nos túbulos de Malpighi expostos ao inseticida dimetoato. Quando foram comparados os grupos controle e expostos ao dimetoato, de forma aguda (Figura 6) e crônica (Figura 7), foi verificado que os grupos expostos demonstraram maior frequência de alteração em todos os dias de análise.

Nos túbulos de Malpighi de *S. postica* expostas ao inseticida dimetoato, no oitavo e décimo dia, a perda de borda em escova foi mais intensa no grupo exposto de forma aguda, em relação ao grupo exposto de forma crônica. Uma possibilidade para esse fato incomum ter ocorrido é que, durante a exposição crônica, a abelha entrou em contato com o inseticida durante os 10 dias de experimento e seu organismo pode ter intensificado o processo de desintoxicação. Logo, há a possibilidade de grande parte do inseticida ter sido metabolizada no intestino, o que fez com que os túbulos de Malpighi fossem afetados menos intensamente, nos últimos dias de análise.

Em relação à alteração perda de borda em escova no intestino exposto ao fungicida azoxistrobina, quando comparou-se os grupos controle e os expostos, de forma aguda (Figura 8) e crônica (Figura 9), verificou-se que em todos os dias de análise (1, 3, 5, 8 e 10) os grupos expostos à azoxistrobina diferiram estatisticamente do grupo controle, sendo que esses grupos expostos apresentaram maior ocorrência de perda de borda em escova. Já sobre a perda de borda em escova nos túbulos de Malpighi expostos a azoxistrobina, verificou-se que ocorreu diferença estatística significativa entre o grupo controle e ambos os expostos, de forma aguda (Figura 10) e crônica (Figura 11), também em todos os dias de análise (1, 3, 5, 8 e 10), uma vez que os grupos expostos apresentaram maior ocorrência de perda de borda em escova.

Dessa forma, não foi possível observar a recuperação dos órgãos, durante a exposição, aguda ou crônica, ao fungicida azoxistrobina, em relação a alteração perda de

borda em escova. Entretanto, quando olhamos para a exposição ao inseticida dimetoato, podemos perceber que o intestino sofreu com perda de borda em escova durante os dias 1, 3, 5 e 8 de análise, porém, no décimo dia não houve essa alteração, o que pode indicar uma recuperação. Esse fato pode ter ocorrido, pois esse dano morfológico corresponde a uma lesão moderada e possivelmente reversível (GRELLA et al., 2019). Já nos túbulos de Malpighi expostos ao dimetoato, não ocorreu recuperação e uma possibilidade para essa evidência é que o intestino começou o processo de recuperação após o oitavo dia, sendo que era o primeiro órgão a entrar em contato com o agrotóxico, logo, para ocorrer a recuperação dos túbulos de Malpighi, provavelmente seria necessário mais tempo.

Soares et al. (2015) realizaram um estudo com a espécie de abelha *S. postica*, onde observaram perda de borda em escova no intestino e nos túbulos de Malpighi de abelhas que foram expostas ao inseticida imidacloprido, via oral, durante 48 horas. Além disso, Grella (2017) também verificou perda de borda em escova no intestino e nos túbulos de Malpighi de *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) exposta a nanodoses do inseticida tiametoxam, durante 24 horas, com concentração igual a 0,0453 ng i.a./ μ L dieta (CL_{50}), que é semelhante com a utilizada no presente trabalho (0,04392 ng/ μ L para o dimetoato e 0,060 ng/ μ L para a azoxistrobina). O resultado obtido por esses autores reforça os encontrados neste estudo, uma vez que também foi verificada perda de borda em escova no intestino e nos túbulos de Malpighi de abelhas, da espécie *S. postica*, expostas ao inseticida dimetoato e ao fungicida azoxistrobina.

Outra alteração observada no intestino foi a eliminação exacerbada de células para o lúmen (Quadros 3, 4, 5 e 6 e Tabelas 1, 2, 3 e 4). As células digestivas são as mais prejudicadas por agrotóxicos, uma vez que possuem maior zona de contato com o lúmen e com substâncias ingeridas (CAETANO et al., 1994). Essas células podem eliminar substâncias tóxicas e, devido a isso, tem a possibilidade de serem eliminadas para o lúmen, a fim de realizarem a desintoxicação (CATAE et al., 2014).

No intestino, quando comparou-se os grupos controle e expostos de forma aguda (Figura 6) e crônica (Figura 7) ao inseticida dimetoato, observou-se que, em relação à eliminação de células para o lúmen, os grupos expostos apresentaram maior incidência dessa alteração no terceiro dia de análise. Já em relação a eliminação de células para o lúmen nos túbulos de Malpighi expostos ao inseticida dimetoato, tanto de forma aguda (Figura 8) quanto crônica (Figura 9), foi possível observar que o grupo controle diferiu estatisticamente dos grupos expostos no oitavo dia de análise, sendo que os grupos expostos apresentaram maior ocorrência dessa alteração.

Já no intestino exposto à azoxistrobina, ainda sobre a alteração células eliminadas para o lúmen, o grupo controle diferiu estatisticamente apenas do grupo exposto de forma crônica (Figura 11) à azoxistrobina, no terceiro dia de análise. O dano de eliminação de células para o lúmen também foi observado nos túbulos de Malpighi expostos ao fungicida, uma vez que, ao comparar os grupos controle e expostos, de forma aguda (Figura 12) e crônica (Figura 13), foi possível verificar que, no quinto dia de análise, o grupo controle diferiu estatisticamente de ambos os grupos expostos, que apresentaram maior ocorrência de células eliminadas para o lúmen.

A partir desses resultados, pode-se inferir que, no intestino, o dano morfológico referente à eliminação de células para o lúmen, foi evidente primeiramente no intestino (terceiro dia de análise), uma vez que é o primeiro órgão a entrar em contato com o agrotóxico e, após ter sido metabolizado e ter ido para a hemolinfa, chegou aos túbulos de Malpighi, porém, mais tardiamente (quinto e oitavo dia de análise).

De acordo com Rossi (2011), as abelhas da espécie *Apis mellifera* apresentaram, no intestino, maior intensidade de células eliminadas para o lúmen após 1 dia de exposição ao inseticida imidacloprido, o que corrobora o presente trabalho, uma vez que, no intestino, os grupos expostos aos agrotóxicos apresentaram maior intensidade desse dano morfológico no terceiro dia de análise. Ademais, Oliveira et al. (2013), também observaram aumento de eliminação de células para o lúmen, no intestino de abelhas *A. mellifera*, devido à exposição ao inseticida tiametoxam.

O trabalho de Catae et al. (2014) corrobora os dados encontrados no presente estudo, a respeito do dano morfológico eliminação de células para o lúmen. No referido trabalho, os autores observaram alterações morfológicas no intestino e nos túbulos de Malpighi de *A. mellifera* exposta a uma concentração subletal do inseticida tiametoxam. Catae et al. (2014) verificaram que, nos primeiros dias de experimento, o intestino apresentou alterações morfológicas mais intensas, em consequência da exposição ao inseticida, porém, os túbulos de Malpighi demonstraram maior prejuízo em relação a essas alterações a partir do terceiro dia de experimento. Isso se deu pois, o primeiro órgão a entrar em contato com o agrotóxico foi o intestino e, seguindo a rota metabólica, os túbulos de Malpighi foram afetados posteriormente, logo, os efeitos mais prejudiciais podem ser vistos primeiro no intestino e, depois, nos túbulos de Malpighi.

Quando as células digestivas perdem a capacidade de realizar corretamente sua função, morrem e são substituídas por células regenerativas diferenciadas, que são produzidas nos ninhos de células regenerativas localizados na base das microvilosidades

do intestino (ZACARIN et al., 2010). E a perda de ninhos de células regenerativas, observada no presente trabalho (Quadro 5 e Tabela 3), é uma lesão considerada grave, possuindo o maior valor de escore (três) (GRELLA et al., 2019). Portanto, danos causados aos ninhos de células regenerativas podem gerar prejuízos irreversíveis ao intestino e, conseqüentemente, comprometer a digestão e a absorção de nutrientes (CRUZ-LANDIM, 2009).

No intestino exposto ao inseticida dimetoato, não foi observada diferença estatística significativa entre o grupo controle e os expostos, de forma aguda (Figura 6) e crônica (Figura 7), em relação a alteração perda de ninhos de células regenerativas. Esse fato pode ter ocorrido provavelmente devido à concentração do inseticida ter sido baixa ou ao sucesso da metabolização e desintoxicação da substância química no órgão.

Já no intestino exposto ao fungicida azoxistrobina, a perda de ninhos de células regenerativas foi observada, no primeiro dia, quando comparamos o grupo controle ao exposto, tanto de forma aguda (Figura 10) como crônica (Figura 11). Já no terceiro dia, o grupo controle diferiu estatisticamente somente do grupo exposto de forma crônica, demonstrando que o grupo exposto de forma crônica apresentou maior prejuízo em relação a perda de ninhos de células regenerativas. A partir das observações dos efeitos do fungicida azoxistrobina, quanto a essa alteração, pode-se inferir que essa substância pode ser tóxica para organismos não-alvos, prejudicando a função de substituição celular que os ninhos de células regenerativas possuem.

Alguns trabalhos também encontraram perda de ninhos de células regenerativas no intestino de abelhas expostas a agrotóxicos, como Grella (2017), ao expor, durante 24 horas, abelhas da espécie *M. scutellaris* a nanodoses do inseticida tiametoxam, observou que ocorreu perda de ninhos de células regenerativas no intestino dessas abelhas. O estudo de Camargo (2019), por sua vez, verificou perda de ninhos de células regenerativas em abelhas da espécie *S. postica* exposta à uma concentração subletal do inseticida clotianidina, durante 8 dias de experimento.

Outra alteração observada foi a picnose (Quadros 3 e 5 e Tabelas 1 e 3). As células com núcleo picnótico podem ser um indício de morte celular e são comuns em tecidos de insetos que estão sofrendo alguma lesão, sendo que, após o início do processo de morte por apoptose ela torna-se irreversível (GREGORC; BOWEN, 1997; DAI; GILBERT, 1997; SILVA-ZACARIN et al., 2008).

No intestino exposto ao dimetoato (Figuras 6 e 7), houve diferença estatística de células com núcleo picnótico apenas no terceiro dia de análise, em dois tipos de

comparações realizadas, sendo elas: quando comparamos o grupo controle ao grupo exposto de forma crônica, na qual o grupo exposto apresentou maior índice de núcleos picnóticos, e quando comparamos os grupos expostos, de forma aguda e crônica, onde o grupo exposto cronicamente demonstrou maior índice de núcleos picnóticos em relação ao grupo exposto de forma aguda.

Já no intestino exposto a azoxistrobina (figuras 10 e 11), ocorreu diferença estatística, em relação a células com núcleo picnótico, nos dias 3, 5 e 10 de análise, em um tipo de comparação feita: quando foram comparados o grupo controle ao grupo exposto de forma crônica, na qual o grupo exposto demonstrou maior índice de picnose. Já quando foram comparados os grupos expostos aguda e cronicamente, foi observado que o grupo exposto de forma crônica apresentou maior ocorrência de núcleo picnóticos nos dias 3, 5 e 10 de análise.

Carneiro et al. (2020) observaram células com núcleo picnótico no intestino de abelhas da espécie *A. mellifera* expostas ao fungicida iprodione, durante 24 horas. Ferreira (2010) também verificou o aumento da frequência e da intensidade de células com núcleos condensados, característica típica de picnose, nos túbulos de Malpighi, de *S. postica*, após 14 dias de exposição a concentrações subletais do inseticida fipronil. Esses dados consolidam os encontrados no presente trabalho, uma vez que foram observadas células com núcleo picnótico em intestino e túbulos de Malpighi de abelhas da espécie *S. postica* exposta a inseticida e fungicida.

Entretanto, nos túbulos de Malpighi expostos, tanto ao inseticida dimetoato (Figuras 8 e 9) quanto ao fungicida azoxistrobina (Figuras 12 e 13), não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos analisados em relação ao dano morfológico células com núcleo picnótico. Uma possibilidade para que esse fato tenha ocorrido é que o intestino foi capaz de realizar grande parte da metabolização do inseticida e do fungicida, logo, quando seguiu-se a rota metabólica para os túbulos de Malpighi, esse órgão não foi afetado pela alteração que é considerada grave e irreversível (GRELLA et al., 2019).

Outra alteração morfológica observada nos túbulos de Malpighi foi o inchaço celular, em todos os dias de análise e grupos, incluindo controle e expostos (Figuras 8, 9, 12 e 13). O inchaço das células pode causar obstrução do lúmen e, então, tem a capacidade de prejudicar o fluxo da urina primária, que será filtrada e transformada em líquido isosmótico e, por fim, excretada (NOCELLI et al., 2016). Segundo Grivicich et al. (2007), o inchaço celular está relacionado à necrose. Em um estudo realizado por Rossi et al.

(2013), também foi verificado inchaço celular em abelhas da espécie *A. mellifera* que foram expostas ao inseticida imidacloprido.

No presente trabalho, o aumento de secreção apócrina e de esferocristais não foi observado no intestino ou nos túbulos de Malpighi de *S. postica*. O aumento de ambas alterações morfológicas pode ser um indicativo de excreção de substâncias nocivas ao funcionamento do órgão do indivíduo (CAETANO et al., 1994). A não verificação de aumento de secreção apócrina e de esferocristais fato pode ter ocorrido devido a essas alterações serem levemente prejudiciais e facilmente reversíveis (GRELLA et al., 2019). Outra possibilidade para esse acontecimento é que as células do intestino e dos túbulos de Malpighi não foram capazes de realizar sua função de excretar substâncias nocivas ao organismo, uma vez que outras alterações morfológicas observadas, como perda de borda em escova e células com núcleo picnótico, provavelmente prejudicaram o funcionamento dessas células e, conseqüentemente, dos órgãos.

De acordo com os resultados obtidos por Catae et al. (2014), quando analisou *A. mellifera* exposta a concentração subletal do inseticida tiametoxam, as alterações observadas no epitélio intestinal indicam que este órgão sofreu danos que comprometem as organelas celulares que produzem proteínas e energias e, conseqüentemente, a fisiologia das células é prejudicada. O intestino é o local do trato digestório onde ocorre a maior parte da digestão e absorção dos nutrientes (CRUZ-LANDIM, 2009), portanto, os efeitos causados pelos agrotóxicos podem interferir negativamente na absorção de nutrientes.

É possível que, durante o processo de digestão, o intestino da abelha não tenha sido capaz de metabolizar totalmente o agrotóxico e, o excesso dessa substância no organismo do inseto, pode ter causado as alterações morfológicas observadas nos túbulos de Malpighi, prejudicando, possivelmente, o processo de excreção da substância. A excreção ineficiente do agrotóxico pode fazer com que essa substância e seus metabólitos permaneçam na hemolinfa e sejam capazes de atingir outros órgãos do indivíduo, como é o caso do inseticida dimetoato, que possui o cérebro como órgão-alvo. E, se esse inseticida atingir o cérebro, a acetilcolina não será degradada e o impulso nervoso se tornará contínuo, podendo levar o sistema nervoso central do inseto ao colapso (YU et al., 2008).

Entretanto, em algumas situações relacionadas à exposição aguda aos agrotóxicos, observou-se que os órgãos podem ter sido capazes de se regenerar ao longo do tempo. Uma possibilidade para esse fato ter ocorrido é que, na exposição aguda, a abelha foi

exposta apenas 1 dia ao alimento contaminado com agrotóxico, logo, teve um tempo hábil mais longo para realizar o processo de desintoxicação, uma vez que o contato com o agrotóxico foi apenas no primeiro dia de experimento. Já na exposição crônica, a abelha teve contato com o alimento contaminado em todos os dias de experimento (10 dias), o que dificultou o processo de desintoxicação por parte do organismo, uma vez que não houve tempo hábil, devido a alimentação contínua contendo o agrotóxico.

Em suma, existem diversos estudos sobre os efeitos de inseticidas em *A. mellifera*, porém, trabalhos sobre os efeitos de outros agrotóxicos, como fungicidas, em abelhas sem ferrão, como *S. postica*, são escassos, principalmente a nível celular. No presente trabalho foi observado que fungicidas também podem causar intensos prejuízos nos órgãos de abelhas nativas. Portanto, ressalta-se a importância de mais estudos a respeito das consequências dessas substâncias químicas nas células de organismos não-alvos, como os polinizadores.

CONCLUSÃO

- O inseticida dimetoato e o fungicida azoxistrobina foram capazes de causar alterações morfológicas reversíveis e irreversíveis no intestino e nos túbulos de Malpighi de *S. postica*, o que pode comprometer as funções específicas de cada órgão.

- Para a maioria dos danos morfológicos causados, principalmente os de médio e alto impacto (escore igual a 2 e 3, respectivamente), a exposição crônica aos agrotóxicos causou prejuízos mais severos do que a exposição aguda, em ambos os órgãos da abelha da espécie *S. postica*.

- No intestino, o fungicida azoxistrobina foi capaz de causar mais alterações morfológicas do que o inseticida dimetoato, uma vez que a perda de ninhos de células regenerativas foi vista somente no grupo exposto ao fungicida, quando comparado ao controle. Já nos túbulos de Malpighi, não foi observada diferença em relação a quantidade de alterações morfológicas causadas pelo fungicida e pelo inseticida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKI, T.; NARA, A.; UEMURA, K. Cytoplasmic vacuolization during exposure to drugs and other substances. **Cell Biology Toxicology** 28: 125–131, 2012.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M.; PARR-DOBRZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, 9. 649-662, 2002.
- BPBES/REBIPP (2019): Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. WOŁOWSKI, M.; AGOSTINI, K.; RECH, A.; VARASSIN, I.; MAUÉS, M.; FREITAS, L.; CARNEIRO, L.; BUENO, R.; CONSOLARO, H.; CARVALHEIRO, L.; SARAIVA, A.; SILVA da, C. Máira C. G. Padgurschi (Org.). 1ª edição, São Carlos, SP: Editora Cubo. 184 páginas. <http://doi.org/10.4322/978-85-60064-83-0>.
- CAETANO, F. H.; TORRES JR., A. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; TOMOTAKE, M. E. M. Apocrine Secretion in the Ant, *Pachycondyla Striata*, Ventriculus (Formicidae: Ponerinae). *Cytobios*. 1994.
- CAMARGO, I. F. Análise dos efeitos do agrotóxico clotianidina no intestino médio e túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae). Trabalho de Conclusão de Curso. 2019.
- CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, n.c., 2003.
- CARNEIRO, L. S.; MARTÍNES, L. C.; GONÇALVES, W. G.; SANTANA, L. M.; SERRÃO, J. E. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 189, p. 109991, 2020.
- CATAE, A.F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 4, p. 274-281, 2014.
- CAVALCANTE V. M., CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: A review. **Naturalia** 24:19–40, 1999.
- CHAPMAN, R. F. The insects: Structure and Function. **American Elsevier**, New York, 819p., 1975.

- COSTA-MAIA, F. M.; LINO-LOURENÇO, D. A.; TOLEDO, V. ASPECTOS ECONÔMICOS E SUSTENTÁVEIS DA POLINIZAÇÃO POR ABELHAS. *Sistemas de Produção Agropecuária (Ciências Agrárias, Animais e Florestais)*. 2010.
- COSTANZA, R., de GROOT, R., BRAAT, L. Twenty years of ecosystem services: How far have we come and how far do we still need to go? *Ecosyst Serv* 28:1–16. 2017.
- CRUZ-LANDIM, C. da, 2009. Abelhas: morfologia e função de sistemas.
- CRUZ-LANDIM, C. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. **Anais Acad. Ciências Est. São Paulo**. 44: 28-49, 1985.
- CRUZ-LANDIM, C., COSTA-LEONARDO, A. M. Ultrastructure Of Cell Renewal In The Midgut Of Termites. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 9, p. 129-130, 1996.
- CRUZ-LANDIM, C.; SILVA-DE-MORAES, R. I. M.; SERRÃO, J. E. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adul worker bees (Hymenoptera, Apidae). **J. Comp. Biol.**, v. 1, 9. 29-40, 1996.
- DAI, J. D., GILBERT, L. I. Programmed cell death of the prothoracic glands of *Manduca sexta* during pupal–adult metamorphosis. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 27, 69–78. 1997.
- DECOURTYE, A; ARMENGAUD, C; RENO, M; DEVILLERS, J; CLUSEAU, S; GAUTHIER, M; PHAM-DELEGUE, M. H. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide of Biochemistry Physiology**, San Diego, v.78, p.83-92, 2004.
- FERREIRA, R. Análise morfológica e histoquímica do corpo gorduroso e dos túbulos de Malpighi de operárias adultas de *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1907) (Hymenoptera, Apidae) tratadas com fipronil e ácido bórico. **Aleph**, 2010.
- FREITAS, B. M.; NUNES-SILVA, P. Polinização agrícola e sua importância no Brasil. IN: IMPERATRIZ-FONSECA, V.; CANHOS, D. A. L.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M. Polinizadores no Brasil - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. **São Paulo: EDUSP**, p. 103-118, 2012.
- GIANNINI, T. C., CORDEIRO, G. D., FREITAS, B. M. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **J Econ Entomol** 108:849–857. 2015.
- GOUGH, H. J; McINDOE, E. C; LEWIS, G. B. The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honey bees (*Apis mellifera* L.) 19811992. **Journal of Apicultural Research**, London, v.33, p.119-125, 1994.

- GREGORC, A.; BOWEN, I. D. Programmed cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae midgut. **Cell Biol. Int.** 21, 151–158. 1997.
- GRELLA, T. C. Efeitos de nanodoses do inseticida tiametoxam para a abelha *Melipona scutellaris* Latreille, 1911 (Hymenoptera, Apidae): da absorção ao órgão alvo. Dissertação (mestrado), 2017.
- GRELLA, T. C.; SOARES-LIMA, H. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. **Chemosphere**, v. 236, 2019.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. da. Morte celular por apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.** 53, 335-343, 2007.
- HEALTH CANADA, Archived-Proposed Re-evaluation Decision PRVD2011-12 Dimethoate. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/cpsspc/pest/part/consultations/_prvd2011-12/prvd2011-12-eng.php>. 2011. Acesso em: 20 jul. 2019.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. Relatório de comercialização de agrotóxicos. 2017. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>, acesso em 15 jun. 2019.
- IPBES. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. **Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**, Bonn. 552p. 2016.
- JUNQUEIRA L. C. U.; JUNQUEIRA L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. **São Paulo: Editora Santos**, 123 p., 1983.
- KERR, W.E.; CUNHA, R.A. Sex determination in bees: XXVI. Masculinism of workers in the Apidae. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.13, n.3, p.479-489. 1990.
- KEVAN, P. G.; BAKER, H.G. Insects as flower visitors and pollinators. **Ann. Rev. Entomology** 28:407-453. 1983.
- KEVAN, P. G.; VIANA, B. F. The global decline of pollination services. **Biodiversity**, 4(4): 3-8, 2003.
- LOURENCETTI, A. P. S. Determinação da Dose Letal Média (DL₅₀) e da Concentração Letal Média (CL₅₀) do fungicida azoxistrobina para abelhas da espécie *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1804). Trabalho de iniciação científica, 2018.

- LOZOWICKA, B. The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, p. 210-222, 2013.
- MACEDO, R. C. Toxicidade do acetamiprido e dimetoato para abelha *Scaptotrigona postica* Latreille, 1804. Dissertação (mestrado), 2016.
- MACIEIRA, O. J. D., PRONI, E. A. Capacidade de resistência a altas e baixas temperaturas em operárias de *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae) durante os períodos de verão e inverno. **Rev. Bras. de Zoo.**, v.21, n.4, p.893-896, 2004.
- MALASPINA, O., SILVA-ZACARIN, E.C.M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.23, n.3-4, p.303-309, 2006.
- MALASPINA, O., SILVA-ZACARIN, E.C.M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.23, n.3-4, p.303-309, 2006.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) – AGROFIT. Bula do produto Amistar WG. 24 p., 2019, disponível em: <file:///C:/Users/leeti/Downloads/F2138153646_Amistar%20WG%20Bula%20Completa_Atendimento%20IN27%20IBAMA_%20(3).pdf> Acesso em 10 ago. 2019.
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) – AGROFIT. Bula do produto Dimexion. 19 p., 2017, disponível em: <file:///C:/Users/leeti/Downloads/F509105994_Bula%20DIMEXION%20-%20Adequac&%23807%3Ba&%23771%3Bo%20IN16%20-%20Rev.%2001%20-%2012dez2017%20(1).pdf> Acesso em 10 ago. 2019.
- MARQUES, M. F.; MENEZES, G. B.; DEPRÁ, M. S.; DELAQUA, G. C. G.; HAUTEQUESTT, A. P.; MORAES, M. C. M. de. **Polinizadores na Agricultura** [s.l:s.n.], 2015.
- MEDRZYCKI, P.; GIFFARD, H.; AUPINEL, P.; BELZUNCES, L. P.; CHAUZAT, M. P.; CLABEN, C.; COLIN, M. E.; DUPONT, T.; GIROLAMI, V.; JOHNSON, R.; CONTE, Y. L.; LUCKMANN, J.; MARZARO, M.; PISTORIUS, J.; PORRINI, C.; SCHUR, A.; SGOLASTRA, F.; DELSO, N. S.; STEEN, J. J. M van der; WALLNER, K.; ALAUX, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; BOGO, G.; BRUNET, J. L.; DELBAC, F.; DIOGON, M.; ALAOUI, H. E.; PROVOST, B.; TOSI, S.; VIADAU, C. Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, London, v.52, p.1-60, 2013.

- MENDIBURU, Felipe de. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.3-1. URL <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>, 2019.
- MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; MARSAIOLI, A. J.; ZAMPIERI, D.; FONTOURA, I. C.; LUCHESSI, A. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A Brazilian Social Bee Must Cultivate Fungus to Survive. **Current Biology**. 6p., 2015.
- MOORE, M. N.; ALLEN, J. I.; SOMERFIELD, P. J. Autophagy: role in surviving environmental stress. **Mar. Environ. Res.** 62, p. 420-425, 2006.
- MOURE, J. S. A preliminary supra-specific classification of the Old World meliponine bees (Hymenoptera, Apoidea). **Studia Entomol.** (ns) 4: 181-242. 1961.
- NOCELLI, R. C. F.; CINTRA-SOCOLOWSKI, P.; ROAT, T.; SILVA-ZACARIN, E.; MALASPINA, O. Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. **Insect Physiol**, 13-23, 2016.
- NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. Riscos de Pesticidas sobre as Abelhas. **III Semana dos polinizadores**, p. 17, 2012.
- NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. **São Paulo: Nogueirapis**, 446p., 1997.
- OLIVEIRA, F. F. de; RICHERS, B. T. T.; SILVA, J. R. da; FARIAS, R. C.; MATOS, T. A. Guia ilustrado das abelhas “sem- ferrão” das Reservas Amanã e Mimirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mimirauá**. 270p., 2013.
- OLIVEIRA, R. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environ Toxicol**. DOI 10.1002/tox.21842. 2013.
- OLLERTON, J., WINFREE, R., TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120:321–326. 2011.
- OMS. World Health Organization. **Dimethoate in Drink Water**. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, 2004.
- PALUDO, C. R.; MENEZES, C.; SILVA-JUNIOR, E. A.; VOLLET-NETO, A.; ANDRADE-DOMINGUEZ, A.; PISHCHANY, G.; KHADEMPOUR, L.; NASCIMENTO, F. S. do; CURRIE, C. R.; KOLTER, R.; CLARDY, J.; PUPO, M. T. Stingless Bee Larvae Require Fungal Steroid to Pupate. **Scientific Reports**. 10p., 2018.

- PETTIS, J. S.; LICHTENBERG, E. M.; ANDREE, M.; STITZINGER, J.; ROSE, R.; vanENGELSDORP, D. Crop Pollination Exposes Honey Bees to Pesticides Which Alters Their Susceptibility to the Gut Pathogen *Nosema ceranae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <<https://www.R-project.org/>>, 2018.
- ROSSI, C. A. Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de Malpighi de *Apis mellifera* africanizada. Dissertação de mestrado. 2011.
- ROSSI, C. A.; ROAT, T.C.; TAVARES, D.A.; SOCOLOWSKI, P. C.; MALASPINA, O. 2013. Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microsc Res Tech** 76:552–558.
- ROST-ROSZKOWSKA, M. M.; POPRAWA, I.; KLAG, J.; MIGULA, P.; MESJASZ-PRZYBYŁOWICZ, J.; PRZYBYŁOWICZ, W. Degeneration of the midgut epithelium in *Epilachna cf. nylanderii* (Insecta, Coccinellidae): apoptosis, autophagy, and necrosis. **Canadian Journal of Zoology** 86: 1179-1188, 2008.
- SAIBT, N. Determinação multirresíduo de agrotóxicos em abelha e pólen apícola empregando método QuEChERS modificado e LC-MS/MS. Dissertação de mestrado. 2017.
- SANCHEZ-BAYO, F. Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 4, p. 1-11, 2012.
- SANTOS, T. C. A.; CRUZ-LANDIM, C. Determinação das castas em *Scaptotrigona postica* (Latreille) (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): diferenciação do ovário. **Revista Brasileira de Zoologia**. Sociedade Brasileira de Zoologia, v. 19, n. 3, p. 703-714, 2002.
- SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Gut Structures In Adult Workers Of Necrophorous Neotropical Stingless Bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Entomologia Generalis**, v. 19, n. 4, p. 261-265, 1995.
- SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of midgut endocrine cells in workers of stingless bee (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Iheringia Série Zoologia**, v.81, p.151-56, 1996.
- SILVA, W.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, n. 3, p. 146-152, 2012.

- SILVA-ZACARIN, E. C. M., CHAUZAT, M. P.; ZEGGANE, S.; DRAJNUDEL, P. SCHURR, F.; FAUCON, J. P.; MALASPINA, O.; ENGLER, J. A. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. **Current microscopy contributions to advances in science and technology**, v 5, p 696-703, 2012.
- SILVA-ZACARIN, E. C. M.; FERREIRA, R. A. C.; NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Structure and function of the intestine and Malpighian tubules: from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. Chapter in *Social Insects: Structure, Function and Behavior*. **Nova Science Publishers, USA**, 27p., 2010.
- SILVA-ZACARIN, E. C. M.; TABOGA, S. R.; de MORAES, R. L. M. S. Nuclear alterations associated to programmed cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Micron**, v. 39, n. 2, p. 117-127, 2008.
- SOARES, H. M.; JACOB, C. R. O.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. 2015. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1488-6>.
- SOARES, L. H.; FAGAN, E. B.; CASAROLI, D.; ANDRADE, D. M. de; SOARES, A. L. MARTINS, K. V.; ROCHA, F. J. da. Aplicação de diferentes estrobilurinas na cultura da soja. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v. 18, n.1, p. 78-97, 2011.
- TRIOLA, M. F. Introdução à estatística. 10^a ed, 722 p., 2008.
- YODER, J. A.; NELSON, B. W.; JAJACK, A. J.; SAMMATATO, D. Fungi and the Effects of Fungicides on the Honey bee Colony. **Beekeeping – From Science to Practice**, 2017.
- YU, F.; WANG, Z.; JU, B.; WANG, Y.; WANG, J.; BAI, D. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. **Experimental and Toxicology Pathology**, v.59, p.15-23, 2008.
- ZALUSKI, R.; JUSTULIN JR, L. A.; ORSI, R. O. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). **Scientific Reports JCR**, v. 7, p. 15217, 2017.

APÊNDICE 1 – FIGURAS

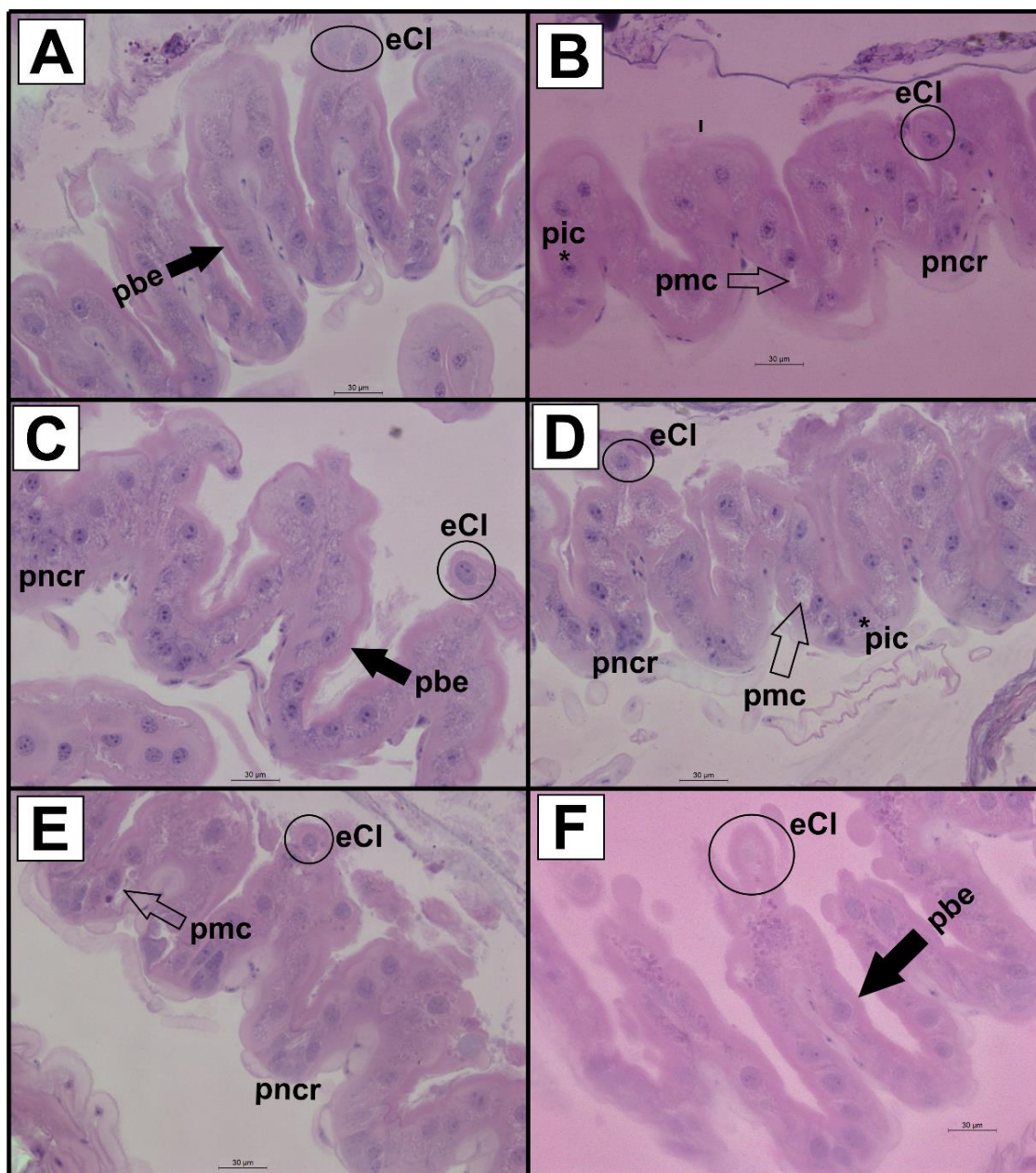


Figura 6. Intestino de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma aguda, ao dimetoato. Controle (A); CL_{50/100} por 1 dia (B); CL_{50/100} por 3 dias (C); CL_{50/100} por 5 dias (D); CL_{50/100} por 8 dias (E) e CL_{50/100} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), perda de ninhos de células regenerativas (pncr) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo) e pic (asterisco). Fonte: elaborada pela autora.

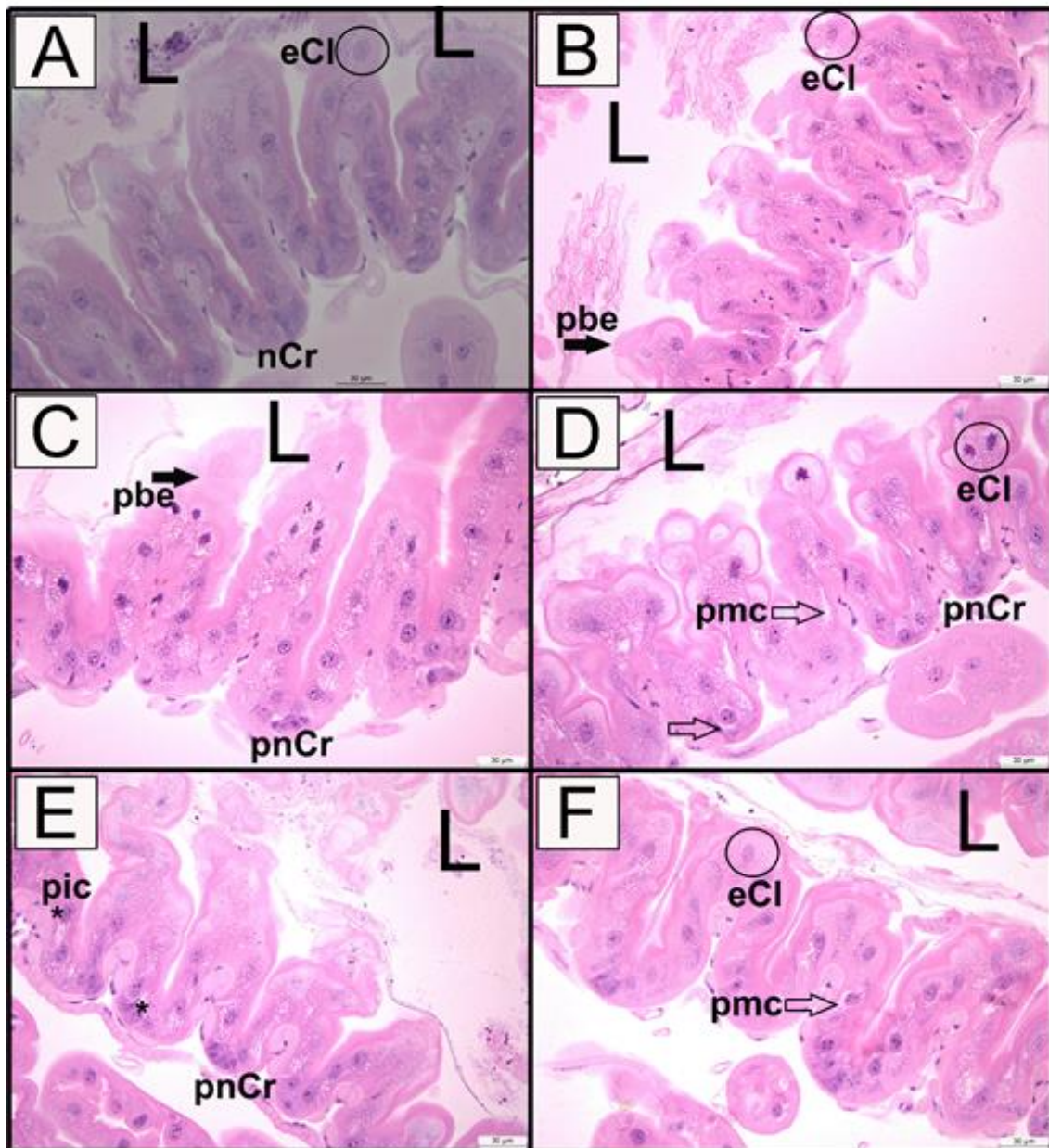


Figura 7. Intestino de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma crônica, ao dimetoato. Controle (A); CL_{50/100} por 1 dia (B); CL_{50/100} por 3 dias (C); CL_{50/100} por 5 dias (D); CL_{50/100} por 8 dias (E) e CL_{50/100} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), perda de ninhos de células regenerativas (pnCr) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo) e pic (asterisco). Fonte: elaborada pela autora.

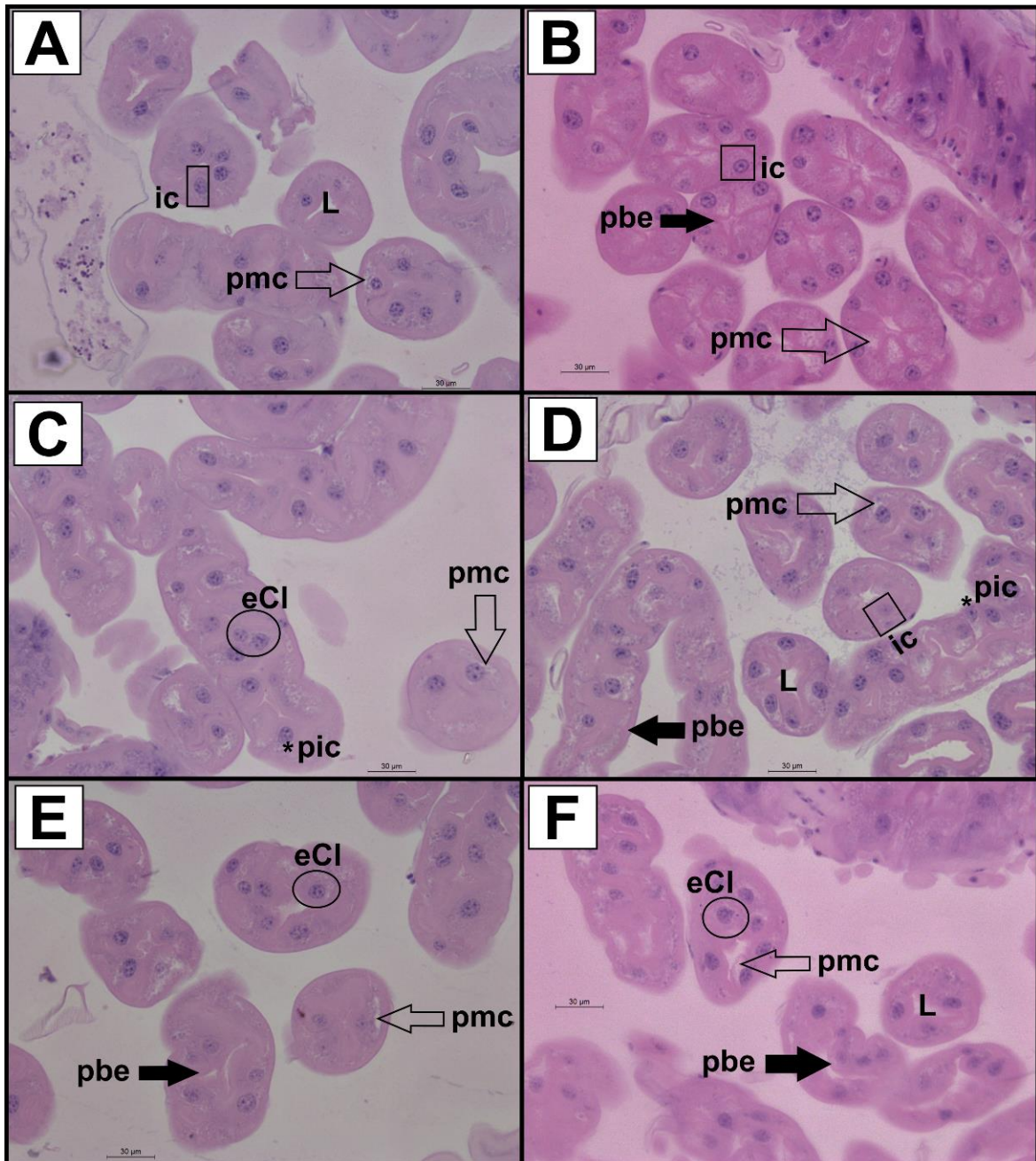


Figura 8. Túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma aguda, ao dimetoato. Controle (A); CL_{50/100} por 1 dia (B); CL_{50/100} por 3 dias (C); CL_{50/100} por 5 dias (D); CL_{50/100} por 8 dias (E) e CL_{50/100} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), inchaço celular (ic) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo); pic (asterisco) e ic (quadrado). Fonte: elaborada pela autora.

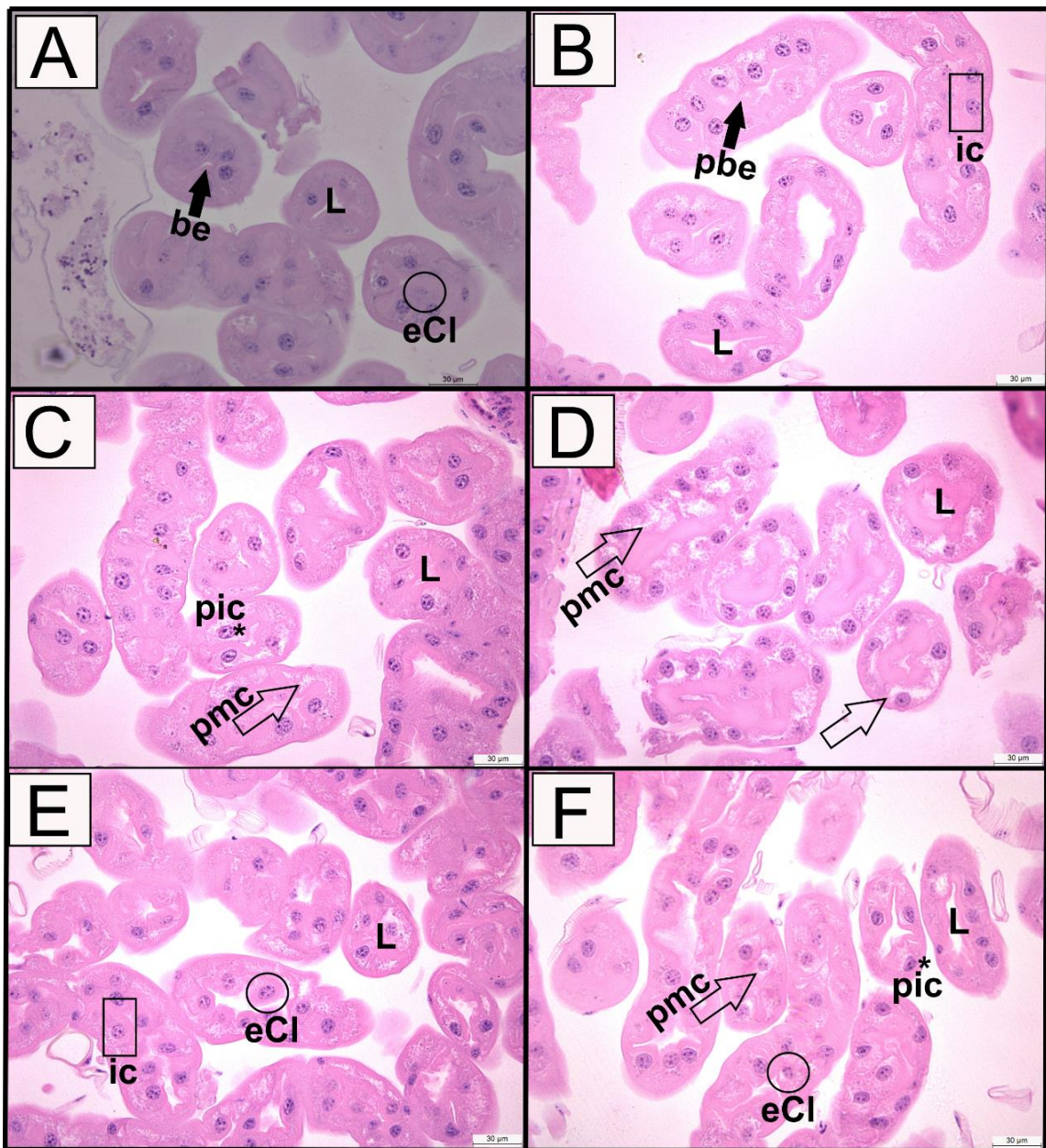


Figura 9. Túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma crônica, ao dimetoato. Controle (A); CL_{50/100} por 1 dia (B); CL_{50/100} por 3 dias (C); CL_{50/100} por 5 dias (D); CL_{50/100} por 8 dias (E) e CL_{50/100} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), inchaço celular (ic) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo); pic (asterisco) e ic (quadrado). Fonte: elaborada pela autora.

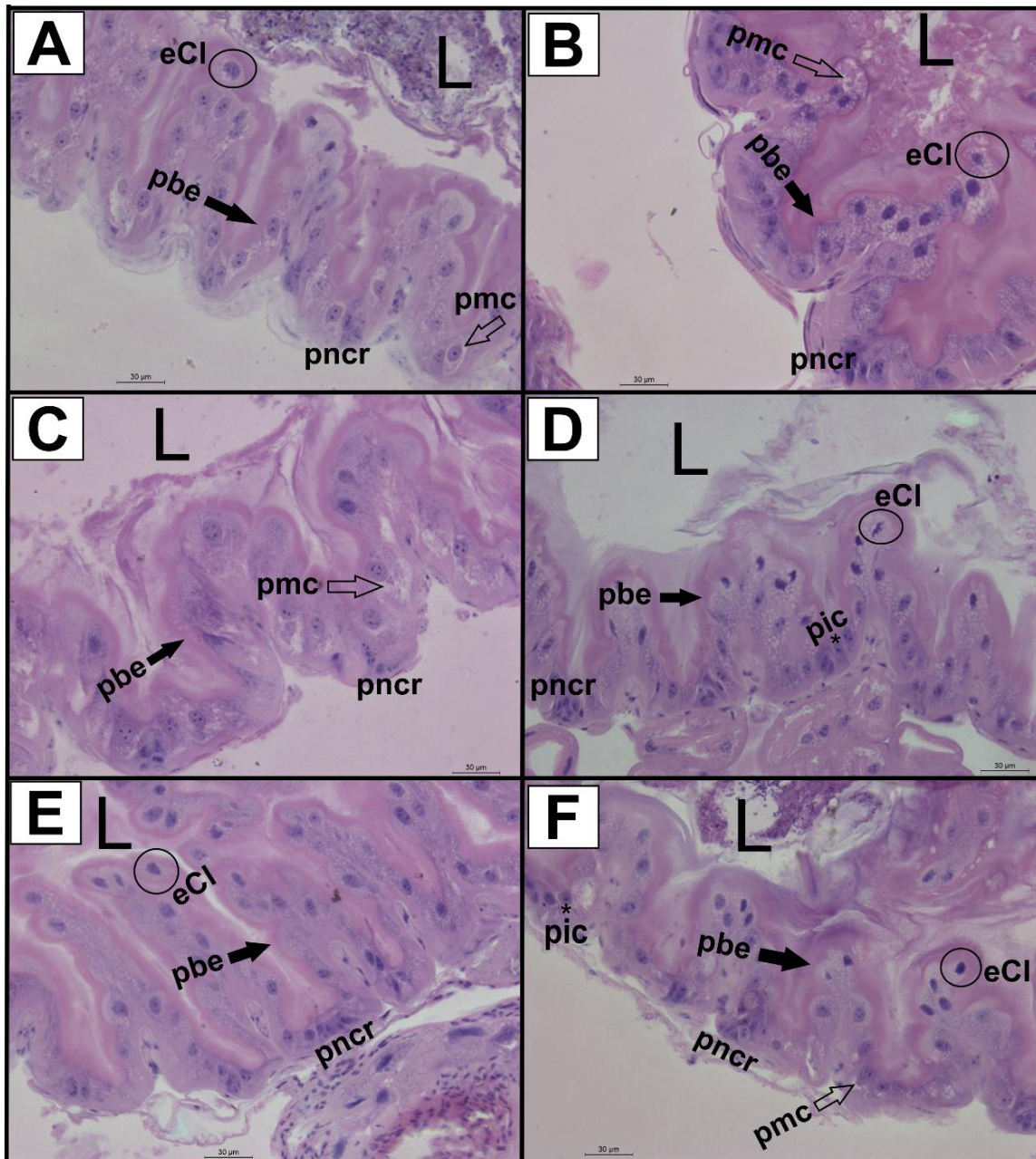


Figura 10. Intestino de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma aguda, à azoxistrobina. Controle (A); C_{média} por 1 dia (B); C_{média} por 3 dias (C); C_{média} por 5 dias (D); C_{média} por 8 dias (E) e C_{média} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), perda de ninhos de células regenerativas (pncr) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo) e pic (asterisco). Fonte: elaborada pela autora.

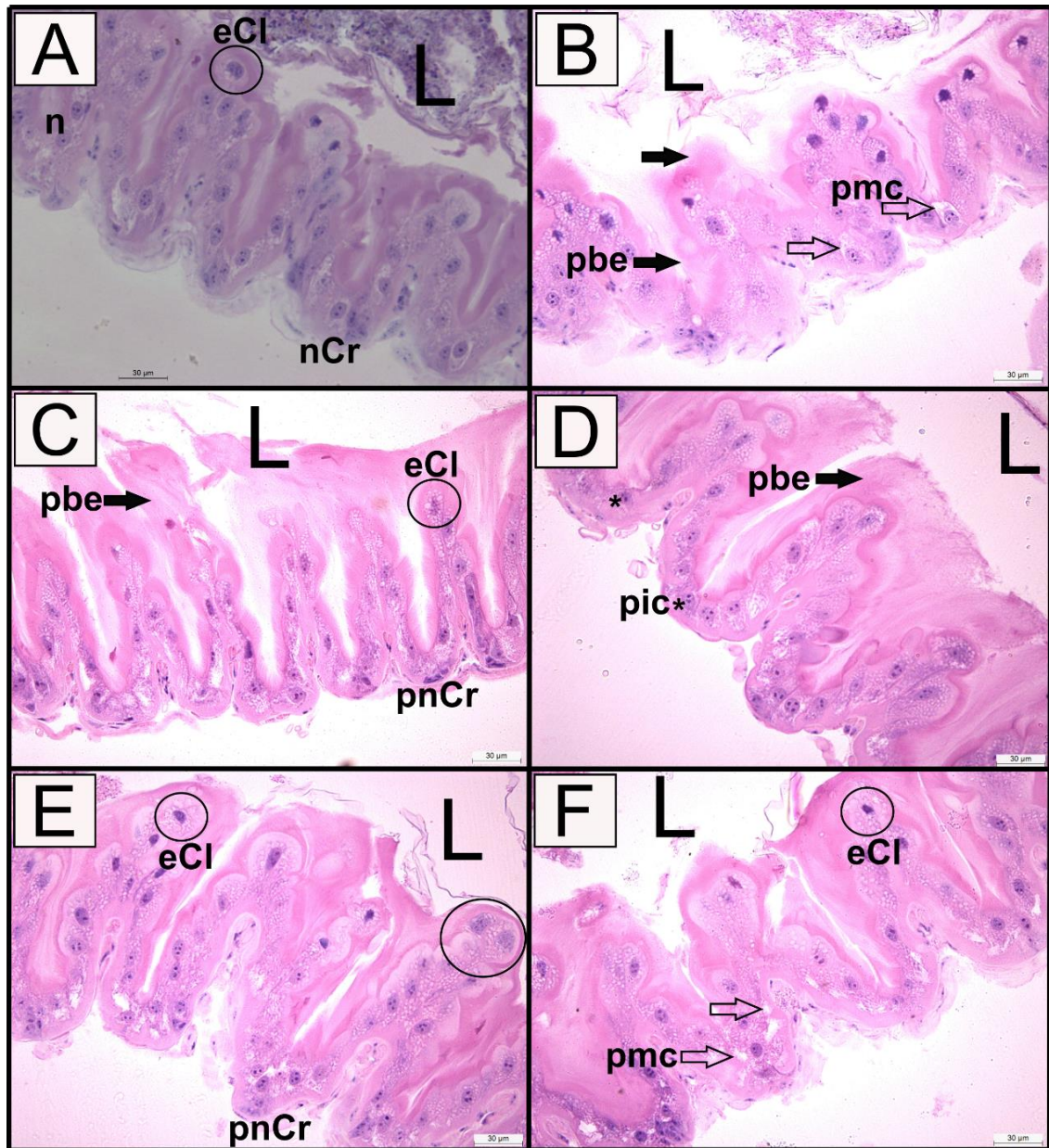


Figura 11. Intestino de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma crônica, à azoxistrobina. Controle (A); $C_{média}$ por 1 dia (B); $C_{média}$ por 3 dias (C); $C_{média}$ por 5 dias (D); $C_{média}$ por 8 dias (E) e $C_{média}$ por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), perda de ninhos de células regenerativas (pnCr) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo) e pic (asterisco). Fonte: elaborada pela autora.

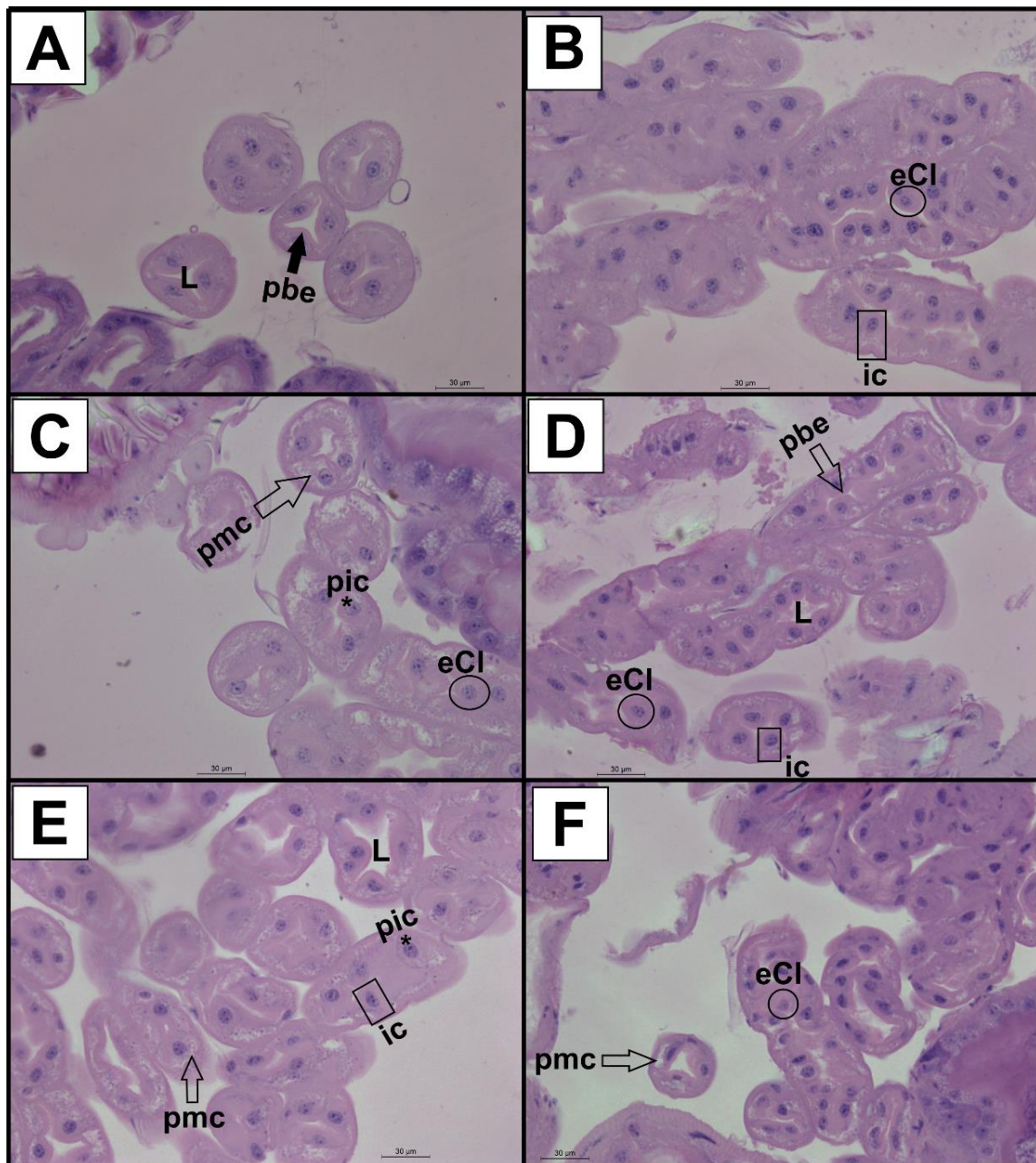


Figura 12. Túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma aguda, à azoxistrobina. Controle (A); C_{média} por 1 dia (B); C_{média} por 3 dias (C); C_{média} por 5 dias (D); C_{média} por 8 dias (E) e C_{média} por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), inchaço celular (ic) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo); pic (asterisco) e ic (quadrado). Fonte: elaborada pela autora.

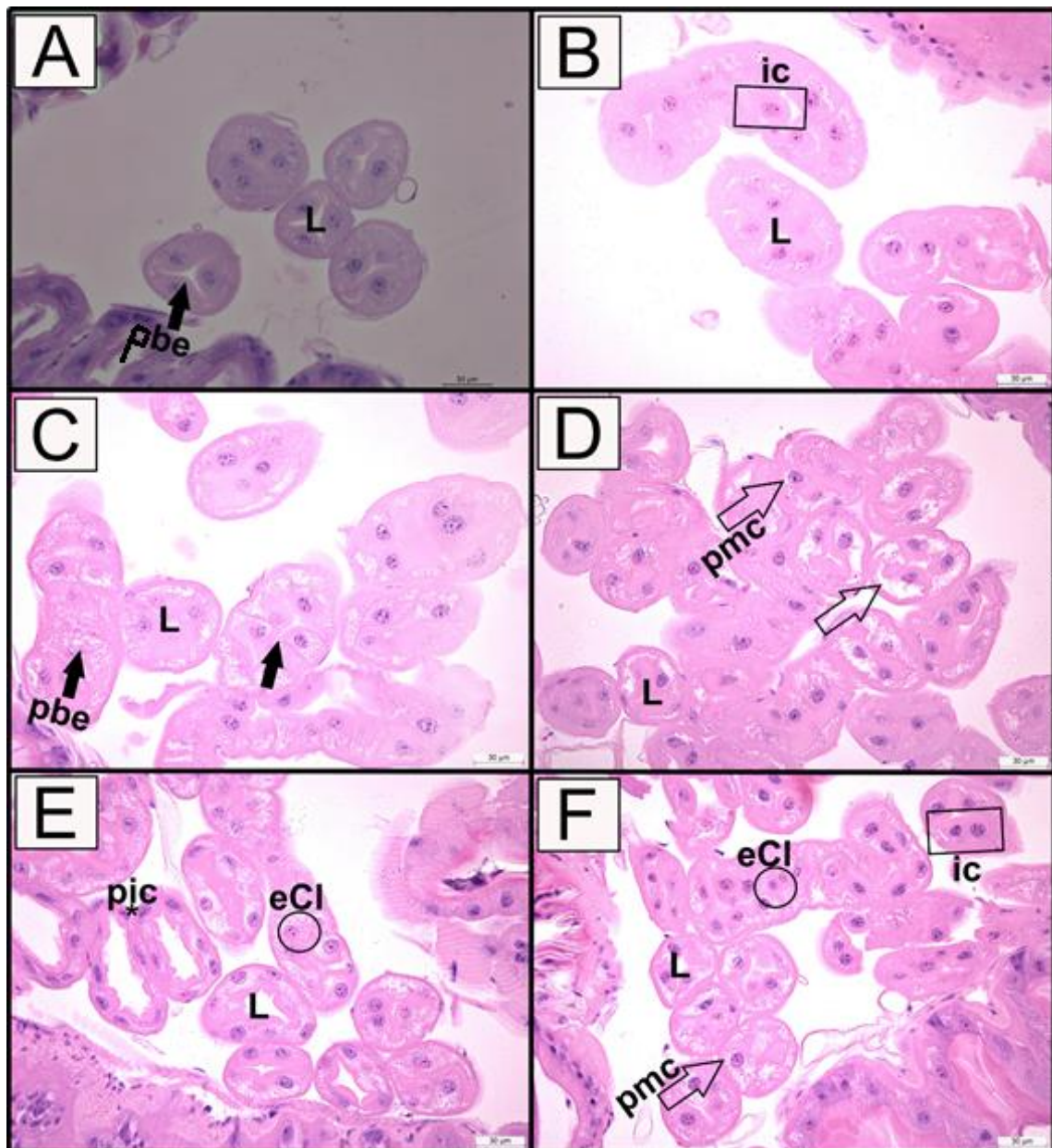


Figura 13. Túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* nas condições experimentais exposta, de forma crônica, à azoxistrobina. Controle (A); $C_{média}$ por 1 dia (B); $C_{média}$ por 3 dias (C); $C_{média}$ por 5 dias (D); $C_{média}$ por 8 dias (E) e $C_{média}$ por 10 dias (F). Coloração Hematoxilina e Eosina. Lúmen (L), perda de material citoplasmático (pmc), perda de borda em escova (pbe), eliminação de células (eCl), inchaço celular (ic) e células com núcleo picnótico (pic). As alterações foram indicadas por símbolos: pbe (seta cheia); pmc (seta vazia); eCl (círculo); pic (asterisco) e ic (quadrado). Fonte: elaborada pela autora.

APÊNDICE 2 – TABELAS

Tabela 1. Análise estatística das alterações morfológicas observadas no intestino de *Scaptotrigona postica* exposta ao dimetoato, de forma aguda e crônica.

Grupo	Dia	pmc	pbe	eCl	pncr	pic
C	1	1.3 ± 0.67 de	8 ± 1.15 bc	4 ± 0 b	6 ± 0 b	6 ± 0 b
C	3	0 ± 0 e	9.3 ± 0.67 bc	4 ± 0 b	8 ± 1 ab	6 ± 0 b
C	5	2.67 ± 0.67 cde	8 ± 1.15 bc	5.3 ± 0.3 ab	8 ± 1 ab	8 ± 1 ab
C	8	0 ± 0 e	8 ± 0 c	5.3 ± 0.3 ab	8 ± 1 ab	6 ± 0 b
C	10	1.3 ± 0.67 de	10.67 ± 0.67 ab	4 ± 0 b	8 ± 1 ab	6 ± 0 b
Dag	1	5.3 ± 0.67 abc	12 ± 0 a	4 ± 0.57 ab	8 ± 1 ab	12 ± 1.73 ab
Dag	3	4 ± 0 bcd	12 ± 0 a	6 ± 0 a	8 ± 1 ab	6 ± 0 b
Dag	5	4 ± 0 bcd	12 ± 0 a	5.3 ± 0.3 ab	12 ± 1.73 ab	8 ± 1 ab
Dag	8	6.67 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	5.3 ± 0.3 ab	14 ± 1 a	6 ± 0 b
Dag	10	4 ± 0 bcd	10.67 ± 0.67 ab	5.3 ± 0.3 ab	8 ± 1 ab	6 ± 0 b
Dc	1	5.3 ± 0.67 abc	12 ± 0 a	4 ± 0.57 ab	8 ± 1 ab	12 ± 1.73 ab
Dc	3	6.67 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	5.3 ± 0.3 ab	10 ± 1 ab	14 ± 2 a
Dc	5	6.67 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	6 ± 0 a	14 ± 1 a	10 ± 1 ab
Dc	8	8 ± 0 a	12 ± 0 a	5.3 ± 0.3 ab	10 ± 1 ab	10 ± 1 ab
Dc	10	6.67 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	4.67 ± 0.3 ab	14 ± 1 a	10 ± 1 ab

Grupo controle (C); grupo exposto ao dimetoato de forma aguda (Dag); grupo exposto ao dimetoato de forma crônica (Dc); perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe); eliminação de células (eCl); perda de ninhos de células regenerativas (pncr) e picnose (pic). As análises foram realizadas em 1, 3, 5, 8 e 10 dias, para todos os grupos. Letras diferentes embaixo dos valores indicam diferenças estatísticas. $p < 0,05$ para todas as análises.

Tabela 2. Análise estatística das alterações morfológicas observadas nos túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* exposta ao dimetoato, de forma aguda e crônica.

Grupo	Dia	pmc	pbe	eCl	pic
C	1	4 ± 0 e	4 ± 0 d	5.3 ± 0.3 ab	6 ± 0 a
C	3	6.67 ± 0.67 cde	4 ± 0 d	6 ± 0 a	14 ± 2 a
C	5	5.3 ± 0.67 de	4 ± 0 d	4.67 ± 0.67 ab	6 ± 0 a
C	8	4 ± 0 e	4 ± 0 d	4 ± 0.57 bc	6.0 ± 0 a
C	10	4 ± 0 e	4 ± 0 d	4.67 ± 0.67 ab	10 ± 2 a
Dag	1	10.67 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	4.67 ± 0.67 ab	14 ± 2 a
Dag	3	8 ± 0 cd	12 ± 0 a	6 ± 0 a	10 ± 2 a
Dag	5	12 ± 0 a	12 ± 0 a	6 ± 0 a	14 ± 2 a
Dag	8	9.3 ± 0.67 bc	12 ± 0 a	6 ± 0 a	6 ± 0 a
Dag	10	10.67 ± 0.67 ab	10.67 ± 0.67 ab	6 ± 0 a	6 ± 0 a
Dc	1	10.67 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	4.67 ± 0.67 ab	14 ± 2 a
Dc	3	9.3 ± 0.67 bc	10.67 ± 0.67 ab	6 ± 0 a	14 ± 2 a
Dc	5	12 ± 0 a	10.67 ± 0.67 ab	6 ± 0 a	14 ± 2 a
Dc	8	12 ± 0 a	9.3 ± 0.67 bc	6 ± 0 a	10 ± 2 a
Dc	10	12 ± 0 a	8 ± 0 c	6 ± 0 a	10 ± 2 a

Grupo controle (C); grupo exposto ao dimetoato de forma aguda (Dag); grupo exposto ao dimetoato de forma crônica (Dc); perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe); eliminação de células (eCl) e picnose (pic). As análises foram realizadas em 1, 3, 5, 8 e 10 dias, para todos os grupos. Letras diferentes embaixo dos valores indicam diferenças estatísticas. p<0,05 para todas as análises.

Tabela 3. Análise estatística das alterações morfológicas observadas no intestino de *Scaptotrigona postica* exposta à azoxistrobina, de forma aguda e crônica.

Grupo	Dia	pmc	pbe	eCl	pncr	pic
C	1	0 ± 0 f	10.67 ± 0.67 b	2 ± 0 d	6 ± 0 b	6 ± 0 c
C	3	1.3 ± 0.67 f	6.67 ± 0.67 c	3.3 ± 0.3 bcd	6 ± 0 b	6 ± 0 c
C	5	1.3 ± 0.67 f	8 ± 0 c	3.3 ± 0.3 bcd	12 ± 1.73 ab	6 ± 0 c
C	8	4 ± 0 de	8 ± 0 c	4.67 ± 0.67 abc	12 ± 0 ab	6 ± 0 c
C	10	4 ± 0 de	8 ± 0 c	4.67 ± 0.67 abc	10 ± 1 ab	6 ± 0 c
Aag	1	2.67 ± 0.67 ef	12 ± 0 a	2.67 ± 0.3 cd	16 ± 1 a	6 ± 0 c
Aag	3	6.67 ± 0.67 bcd	12 ± 0 a	4 ± 0.57 abcd	10 ± 2 ab	6 ± 0 c
Aag	5	5.3 ± 0.67 cd	12 ± 0 a	4.67 ± 0.3 abc	16 ± 1 a	6 ± 0 c
Aag	8	4 ± 0 de	12 ± 0 a	4 ± 0.57 abcd	14 ± 1 a	10 ± 2 bc
Aag	10	4 ± 0 de	12 ± 0 a	6 ± 0 a	14 ± 1 a	6 ± 0 c
Ac	1	2.67 ± 0.67 ef	12 ± 0 a	2.67 ± 0.3 cd	16 ± 1 a	6 ± 0 c
Ac	3	10.67 ± 0.67 a	12 ± 0 a	6 ± 0 a	14 ± 2 a	14 ± 1 a
Ac	5	9.3 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	5.3 ± 0.3 ab	12 ± 1.73 ab	14 ± 1 a
Ac	8	9.3 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	6 ± 0 a	12 ± 1.73 ab	8 ± 1 bc
Ac	10	6.67 ± 0.67 abc	12 ± 0 a	6 ± 0 a	14 ± 1 a	12 ± 1.73 ab

Grupo controle (C); grupo exposto a azoxistrobina de forma aguda (Aag); grupo exposto a azoxistrobina de forma crônica (Ac); perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe); eliminação de células (eCl); perda de ninhos de células regenerativas (pncr) e picnose (pic). As análises foram realizadas em 1, 3, 5, 8 e 10 dias, para todos os grupos. Letras diferentes embaixo dos valores indicam diferenças estatísticas. $p < 0,05$ para todas as análises.

Tabela 4. Análise estatística das alterações morfológicas observadas nos túbulos de Malpighi de *Scaptotrigona postica* exposta à azoxistrobina, de forma aguda e crônica.

Grupo	Dia	pmc	pbe	eCl
C	1	6.67 ± 0.67 cd	4 ± 0 c	6 ± 0 a
C	3	4 ± 0 d	4 ± 0 c	6 ± 0 a
C	5	8 ± 0 c	4 ± 0 c	5.3 ± 0.3 b
C	8	6.67 ± 0.67 cd	4 ± 0 c	6 ± 0 a
C	10	8 ± 0 c	4 ± 0 c	6 ± 0 a
Aag	1	9.3 ± 0.67 bc	10.67 ± 0.67 ab	6 ± 0 a
Aag	3	10.67 ± 0.67 ab	9.3 ± 0.67 b	6 ± 0 a
Aag	5	8 ± 0 c	12 ± 0 a	6 ± 0 a
Aag	8	8 ± 0 c	12 ± 0 a	6 ± 0 a
Aag	10	8 ± 0 c	12 ± 0 a	6 ± 0 a
Ac	1	9.3 ± 0.67 bc	10.67 ± 0.67 ab	6 ± 0 a
Ac	3	10.67 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	6 ± 0 a
Ac	5	10.67 ± 0.67 ab	12 ± 0 a	6 ± 0 a
Ac	8	12 ± 0 a	12 ± 0 a	6 ± 0 a
Ac	10	12 ± 0 a	10.67 ± 0.67 ab	6 ± 0 a

Grupo controle (C); grupo exposto a azoxistrobina de forma aguda (Aag); grupo exposto a azoxistrobina de forma crônica (Ac); perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe); eliminação de células (eCl) e picnose (pic). As análises foram realizadas em 1, 3, 5, 8 e 10 dias, para todos os grupos. Letras diferentes embaixo dos valores indicam diferenças estatísticas. $p < 0,05$ para todas as análises.