

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA E DO  
INSETICIDA ACETAMIPRIDA EM ABELHAS EUSSOCIAIS  
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

**CAIO EDUARDO DA COSTA DOMINGUES**

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA E DO  
INSETICIDA ACETAMIPRIDA EM ABELHAS EUSSOCIAIS  
(HYMENOPTERA: APIDAE)**

**CAIO EDUARDO DA COSTA DOMINGUES**

**Orientador:** Prof. Dr. Osmar Malaspina

**Coorientadora:** Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro - SP  
2021**

D671a Domingues, Caio Eduardo da Costa  
Análise dos efeitos do fungicida piraclostrobina e do inseticida acetamiprida em abelhas eussociais (Hymenoptera: Apidae) / Caio Eduardo da Costa Domingues. -- Rio Claro, 2021  
187 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Osmar Malaspina  
Coorientadora: Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

1. Apis mellifera. 2. Biomarcadores. 3. Biomonitoramento. 4. Concentrações residuais. 5. Melipona scutellaris. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE DOS EFEITOS DO FUNGICIDA PIRACLOSTROBINA E DO INSETICIDA ACETAMIPRIDA EM ABELHAS EUSSOCIAIS (HYMENOPTERA: APIDAE)

**AUTOR: CAIO EDUARDO DA COSTA DOMINGUES**

**ORIENTADOR: OSMAR MALASPINA**

**COORIENTADORA: ELAINE CRISTINA MATHIAS DA SILVA ZACARIN**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



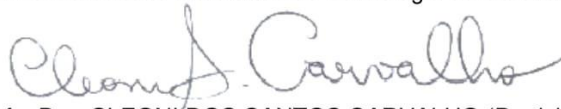
Prof. Dr. OSMAR MALASPINA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro




Profa. Dra. CRISTIANE RONCHI DE OLIVEIRA (Participação Virtual)  
UniAnchieta / Centro Universitário Padre Anchieta



Profa. Dra. SILVIA PIERRE IRAZUSTA (Participação Virtual)  
FATEC Sorocaba / Faculdade de Tecnologia de Sorocaba



Profa. Dra. CLEONI DOS SANTOS CARVALHO (Participação Virtual)  
UFSCar Sorocaba / Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. ARMINDO ANTONIO ALVES (Participação Virtual)  
x / x

Rio Claro, 03 de março de 2021

*Dedico esta tese e todas as minhas conquistas acadêmicas...  
Aos meus amados pais, Siomara Maria da Costa Domingues e Carlos  
Eduardo Lealdini Domingues, pelo amor infindável, pelos esforços  
incessáveis, por tudo que abdicaram para investirem na minha formação e  
pelo exemplo que são para mim. Amo vocês!  
À memória de minha avó, Alaíde Táparo Bernardes da Costa, por todo amor  
dedicado ao longo de sua vida, pelos eminentes valores que me ensinou e por  
sempre me incentivar nos estudos. Saudade eterna.  
À minha maior inspiração acadêmica, Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias  
da Silva Zacarin, por tudo que fez por mim e pela importância imensurável  
que representa na minha vida. Muito obrigado!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram e me encorajaram a seguir o deslumbrante e instigador caminho da pesquisa científica, mesmo em tempos pandêmicos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), câmpus de Rio Claro. Ao Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) e ao Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), pelo ensino público de excelente qualidade (ensino, pesquisa e extensão), e por me fornecerem toda a estrutura para o desenvolvimento da presente tese de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) (PPGBCM), pela qualidade das disciplinas oferecidas e a Seção Técnica de Pós-Graduação do Instituto de Biociências (STPGIB) e a Biblioteca do Instituto de Biociências, pelo suporte acadêmico.

À Universidade de Coimbra (UC), Portugal. Ao *Centre for Functional Ecology* (CFE) e ao *Soil Ecology and Ecotoxicology Laboratory* (SEEL), pelo acolhimento afetuoso que recebi durante todo o período que morei em Portugal e por todo o suporte disponibilizado na minha pesquisa científica.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), câmpus de Sorocaba. Ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Abelhas (NuPECA) e ao Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental (LEIA), onde desenvolvi o meu mestrado e parte da minha pesquisa de doutorado.

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

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa de doutorado no país (*Processo número 2016/15743-7*) e pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE) (*Processo número 2018/05072-3*). Sou extremamente grato pelo suporte financeiro durante toda minha pós-graduação.

Ao prof. Dr. Osmar Malaspina, pela excelente orientação ao longo de todo o meu doutorado e por sempre acreditar em mim, pelo incentivo em todos os projetos, por todas as inúmeras oportunidades a mim proporcionadas, pelos ensinamentos, pela atenção, pelos conselhos e pela amizade. Muito obrigado por tudo!

À profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, pela incrível coorientação (orientação) ao longo do doutorado, pelos ensinamentos e por todo o tempo dedicado na minha formação, pela atenção, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, por ser uma

inspiração e por nunca me abandonar. Você é o meu maior exemplo profissional e uma pessoa maravilhosa. Obrigado pela nossa amizade verdadeira e por tudo que passamos durante todos esses anos. Estarei sempre com você, em qualquer situação, por mais difícil que pareça. Você é muito especial na minha vida, minha segunda mãe. Amo você.

Ao prof. Dr. José Paulo Filipe Afonso de Sousa, pela oportunidade de desenvolver parte do meu doutorado na UC - Portugal, pela admirável supervisão, por acreditar em mim e no meu trabalho, pela atenção e pelos ensinamentos, sou muito grato.

Ao prof. Dr. Giuliano Grici Zacarin, pela amizade verdadeira construída ao longo de toda minha jornada acadêmica. Agradeço por todo o incentivo nos estudos, pelos ensinamentos, pelos conselhos e por todos os momentos compartilhados. Obrigado por ser um dos responsáveis por despertar o meu amor pela ciência e pela pesquisa acadêmica. Você é muito especial na minha vida.

À profa. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela amizade, pelos ensinamentos, pela ajuda, pela recepção no grupo de pesquisa e por todos os momentos compartilhados. Obrigado Ro.

À profa. Dra. Thaisa Cristina Roat, pela amizade, por todos os ensinamentos ao longo do meu doutorado e por sempre acreditar em mim. Muito obrigado mesmo.

A todos os professores que tive durante minha vida, pelos ensinamentos, pela atenção, pelo apoio e paciência. Muito obrigado.

À Necis Miranda de Lima, pela amizade, pelas conversas e risadas, pelos momentos compartilhados e pelo suporte incrível para o desenvolvimento dos meus projetos. Obrigado por tudo.

Aos apicultores de Rio Claro e Sorocaba, Antonio Sergio Pascon e Edson Sampaio, pela amizade, pela manutenção das colônias e coleta das abelhas para realização dos bioensaios laboratoriais.

Aos funcionários do Departamento de Biologia da UNESP - Rio Claro, Gerson Mello Souza, Mônica Iamonte, Antonio Teruyoshi Yabuki e Cristiane Marcia Mileo, pelo auxílio na minha pesquisa, pela atenção e pelos momentos descontraídos.

Ao técnico administrativo do Centro de Ciências Humanas e Biológicas (**CCHB**) da UFSCar Sorocaba, Fernando Urban Gamero, pelo auxílio e amizade.

Aos amigos que a Junção GAP, Primeiros Passos na Ciência e BioCelMol me deram a oportunidade de conhecer e conviver. Obrigado pelos momentos incríveis que passamos.

Agradeço os meus queridos amigos que fiz nos diferentes laboratórios do Brasil: Adriana (Argentina), Aline Catae, Ana Carolina Batista, Beatriz Pereira, Carina Silva, Cristiane Oliveira, Corina Barrera (Argentina), Daiana Tavares, Elisangela Fernandes, Gisele Possignolo, Gregório (México), Hellen Soares, Isabella Camargo, Josimere Assis, Letícia Ceschi, Moema Hausen, Monique Souza, Nicole Butolo, Rodrigo Barbosa, Thamiris Sipriano, Vanessa Bezerra, por todos os momentos e as experiências compartilhadas.

À Pâmela Decio pela amizade construída no CEIS e pela parceria diária que temos na UFSCar Sorocaba.

À Rafaela Tadei, pela amizade, pelos momentos que compartilhamos ao longo dos anos e por toda ajuda disponibilizada nos meus bioensaios laboratoriais na UFSCar Sorocaba.

Ao Heraldo Mauch, por me escolher como orientador e por acreditar em mim, pela amizade, por toda ajuda nos meus experimentos e por todos os momentos compartilhados. Obrigado.

Aos meus grandes amigos Patricia Azevedo e Luciano Delmondes, por tudo que fizeram por mim em Rio Claro, pelos conselhos, pelos momentos maravilhosos compartilhados e por estarem sempre comigo. Obrigado.

Ao meu amigo de infância, Karel Pianez Nieri, pelo apoio ao longo de todo o meu período acadêmico e por não desistir de mim.

Agradeço a todos os inúmeros amigos queridos que fiz em Portugal, vocês foram essenciais nesse período e contribuíram para melhor experiência acadêmica e pessoal da minha vida. Um agradecimento especial ao Artur Sarmiento, Mykola Rasko/Jack (Campeão), Nuno Capela e Rúben Mina, pelo acolhimento indescritível que recebi desde o primeiro dia que desembarquei em Portugal, pelos projetos que desenvolvemos juntos, pelos ensinamentos que compartilharam, pela paciência que tiveram comigo, pelos momentos de dificuldade que me ajudaram a superar, por todos os incontáveis momentos engraçados que desfrutamos juntos, por tudo que fizeram por mim e por se tornarem amigos/irmãos tão especiais na minha vida. Vocês transformaram esse período de estudos simplesmente inesquecível, eu amo vocês!

Ao meu amigo/irmão Paulo José Balsamo, pelo companheirismo desde o início do meu mestrado, por todas as dificuldades que me ajudou a superar, pelas conversas que se alongavam até de madrugada, pela parceria nos congressos, por gentilmente ceder um lugar no seu apartamento para conclusão do meu doutorado, por tudo que faz por mim e pela amizade verdadeira. Te admiro muito e agradeço por estar na minha vida.



À minha amiga Lais Vieira Bello Inoue, pela nossa amizade, por tudo que fez por mim nesse doutorado, por participar em praticamente todos os meus bioensaios, por todas as vezes que abdicou do seu final de semana para me ajudar, por acreditar em mim e nas minhas ideias, por todos os momentos engraçados e tensos que compartilhamos na UNESP ou em Rio Claro, pelos congressos e passeios que desfrutamos, por ser essa pessoa incrível que admiro muito. Obrigado de coração, Nem.

Ao meu grande amor, Leticia Salvioni Ansaloni, por tudo que acrescentou de bom na minha vida desde o dia que te conheci, por me amar e me fazer extremamente feliz, por confiar e respeitar as minhas convicções, por todos os momentos de dificuldade que superamos juntos, por todos os momentos incríveis que passamos e por todos aqueles que ainda viveremos. Obrigado por todo o apoio, pelo incentivo, pelos conselhos, por ter muita paciência com a minha dedicação ao trabalho e por participar da realização deste sonho. Te amo muito.

Aos meus pais, Siomara e Carlos, por toda dedicação que tiveram ao longo dos anos para me proporcionarem uma excelente formação acadêmica, pelos valores e princípios que levarei para o resto da minha vida, por todas as dificuldades superadas, pelos momentos maravilhosos que compartilhamos e por todos os outros que ainda iremos compartilhar e por todo o amor. Essa realização eu divido com vocês. Obrigado por tudo que fizeram e fazem por mim, amo vocês.

Ao gatinho Lilico.

*“O desejo profundo da humanidade pelo  
conhecimento é justificativa suficiente para nossa  
busca contínua”  
(Stephen Hawking)*

## RESUMO

As abelhas são essenciais na preservação de ecossistemas e muito importantes na agricultura, tendo em conta a relevância dos serviços ecossistêmicos de polinização prestados por estes insetos. A espécie *Apis mellifera* é a principal polinizadora em culturas agrícolas, proporcionando benefícios na qualidade e quantidade da produção de muitas espécies utilizadas na alimentação humana. Em contrapartida, a espécie nativa sem ferrão *Melipona scutellaris* é vital para a manutenção da flora nativa. No entanto, o uso de agrotóxicos associado à fragmentação de habitats e agricultura intensiva são uma ameaça às populações dessas espécies de abelhas. Tendo isso em vista, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos biológicos do fungicida piraclostrobina, em escala individual e subindividual, de larvas, recém-emergidas e forrageiras de *A. mellifera* Africanizada e forrageiras de *M. scutellaris*, bem como avaliar o desenvolvimento de colônias de *A. mellifera iberiensis* antes e após exposição ao inseticida acetamiprida em plantações de eucaliptos em Portugal. Na primeira parte da pesquisa, conduzida em laboratório, larvas de *A. mellifera* Africanizada receberam dieta artificial, *in vitro*, contendo três concentrações de piraclostrobina [911,25 ng/mL; 94,06 ng/mL e 30,25 ng/mL], do terceiro ao sexto dia de alimentação. Após a exposição, larvas de quinto instar e recém-emergidas foram dissecadas, processadas histologicamente para avaliação imuno-histoquímica por meio do diagnóstico de morte celular no epitélio do intestino e marcação de quitina na matriz peritrófica. Efeitos prejudiciais no desenvolvimento pós-embrionário não foram observados. Entretanto, as concentrações mais altas de piraclostrobina induziram lesões no intestino, como morte celular, e aumento na intensidade de marcação de quitina na matriz peritrófica das larvas e recém-emergidas. Na segunda parte da pesquisa laboratorial, abelhas recém-emergidas e forrageiras de *A. mellifera* Africanizada e *M. scutellaris* foram submetidas a exposição oral por cinco dias, a três concentrações residuais de piraclostrobina [0,125 ng i.a./mL; 0,025 ng i.a./mL e 0,005 ng i.a./mL]. Os parâmetros observados foram tempo de sobrevivência dos adultos, análises morfológicas, qualitativas e semiquantitativas, e histoquímicas. Os resultados demonstraram redução da longevidade, aumento nos índices totais de lesões e diminuição na intensidade de marcação de macromoléculas como proteínas, polissacarídeos neutros e glicoconjugados, no intestino médio das forrageiras de *A. mellifera* e *M. scutellaris*. As operárias recém-emergidas de *A. mellifera* não apresentaram redução da sobrevivência e lesões no intestino médio, contudo, houve redução de intensidade de marcação para polissacarídeos neutros e glicoconjugados. Como consequência da exposição ao piraclostrobina, a saúde individual de ambas as espécies foi afetada e isso pode comprometer e prejudicar a manutenção da saúde da colônia. Nesse sentido, estudos com concentrações residuais de fungicidas presentes no alimento e os seus efeitos em diferentes espécies de abelhas são relevantes para estimar a sensibilidade interespecífica e subsidiar futuros programas de avaliação de risco das abelhas. Em relação à pesquisa conduzida em Portugal, duas janelas de estudo foram selecionadas em paisagens dominadas por eucaliptos. No centro de cada local foi instalado um apiário, sendo definidos como apiário controle e apiário com aplicação pontual de acetamiprida. O monitoramento foi realizado durante seis meses, onde a saúde e o desenvolvimento das colônias, bem como a distância de forrageamento, presença de resíduos de agrotóxicos e a utilização de recursos nas paisagens foram avaliadas. Os resultados demonstraram que não houve diferença no desenvolvimento das colônias, observados por meio da população adulta, células de ninho e produção de mel entre os locais, antes e após exposição ao inseticida. A distância de forrageamento das colônias do apiário aplicação indicaram que menos de 4% entraram em contato com o raio da aplicação pontual. A coleta de recursos pelas colônias demonstrou-se mais intensa antes da aplicação de

acetamiprida, com destaque para as espécies da vegetação arbustiva e subarbustiva. Apesar disso, resíduos de acetamiprida foram detectados em amostras de pólen e *bee bread*. Diante do exposto, o período de aplicação do inseticida não foi prejudicial para as colônias, contudo, os resultados se aplicam as condições específicas do local estudado. Desta maneira, os parâmetros utilizados no monitoramento das colônias ofereceram informações importantes que podem contribuir para uma menor exposição das abelhas nas diferentes paisagens em que os agrotóxicos são utilizados.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*. Biomarcadores. Biomonitoramento. Concentrações residuais. *Melipona scutellaris*.

## ABSTRACT

Bees are essential in the preservation of ecosystems and important in agriculture, considering the relevance of the ecosystem services of pollination provided by these insects. *Apis mellifera* is the main pollinator in crops, providing benefits in the quality and quantity of the production of many species used in human food. In contrast, the stingless native species *Melipona scutellaris* is vital for the maintenance of native flora. However, the use of pesticides associated with habitat fragmentation and intensive agriculture are a threat to the populations of these bee species. Keeping this in view, the present study aimed to evaluate the biological effects of fungicide pyraclostrobin, on an individual and subindividual scale, of larvae, newly emerged bees, and foragers of Africanized *A. mellifera* and foragers of *M. scutellaris*, as well as to evaluate the development of *A. mellifera iberiensis* colonies before and after exposure to the insecticide acetamiprid in eucalyptus plantations in Portugal. In the first part of the research, conducted in the laboratory, Africanized *A. mellifera* larvae were given an artificial diet, *in vitro*, containing three concentrations of pyraclostrobin [911,25 ng/mL; 94,06 ng/mL and 30,25 ng/mL], from the third to the sixth day of feeding. After exposure, fifth instar larvae and newly emerged bees were dissected, processed histologically for immunohistochemical evaluation through the diagnosis of cell death in the intestine epithelium and chitin marking in the peritrophic matrix. Harmful effects on post-embryonic development were not observed. However, higher concentrations of pyraclostrobin induced lesions in the intestine, such as cell death, and increased intensity of chitin marking in the peritrophic matrix of larvae and newly emerged bees. In the second part of the laboratory research, newly emerged bees, and foragers of Africanized *A. mellifera* and *M. scutellaris* were subjected to oral exposure for five days to three residual concentrations of pyraclostrobin [0.125 ng a.i./mL; 0.025 ng a.i./mL and 0.005 ng a.i./mL]. The parameters observed were survival rate, morphological, qualitative and semi-quantitative analyses, and histochemicals. The results showed a reduction in longevity, an increase in the total lesions index and a decrease in the labeling intensity of macromolecules such as proteins, neutral polysaccharides and glycoconjugates, in the midgut of foragers of *A. mellifera* and *M. scutellaris*. The newly emerged workers of *A. mellifera* did not present reduction of survival and lesions in the midgut, however, there was a reduction of labeling intensity for neutral polysaccharides and glycoconjugates. As a consequence of exposure to pyraclostrobin, the individual health of both species has been affected and this can compromise and harm the maintenance of the health of the colony. In this sense, studies with residual concentrations of fungicides present in food and their effects on different bee species are relevant to estimate interspecific sensitivity and to subsidize future programs of risk assessment of bees. Regarding the research conducted in Portugal, two areas were selected in landscapes dominated by eucalyptus. In the center of each location was installed an apiary, in which were defined as a control apiary and apiary with a punctual application of acetamiprid. The monitoring was carried out over six months, where the health and development of the colonies, as well as the foraging ranges, presence of pesticide residues and the use of resources in the landscapes were evaluated. The results showed that there was no difference in the development of the colonies, observed through the adult population, nest cells and honey production between the sites, before and after exposure to the insecticide. The foraging ranges of the apiary application colonies indicated that less than 4% came in contact with the radius of the point application. The collection of resources by the colonies proved to be more intense before the application of acetamiprid, with emphasis on species of shrub and subarbustive vegetation. Nevertheless, acetamiprid residues were detected in pollen and bee bread samples. Therefore, the period of application of the insecticide was not harmful to the colonies,

however, the results apply to the specific conditions of the site studied. In this way, the parameters used in the monitoring of the colonies offered important information that can contribute to a lower exposure of the bees in the different landscapes where the pesticides are used.

**Keywords:** *Apis mellifera*. Biomarkers. Biomonitoring. Residual concentrations. *Melipona scutellaris*.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	19
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3 CAPÍTULO 1</b> .....	26
<b>Efeitos da exposição larval ao fungicida piraclostrobina no desenvolvimento pós-embriônico de operárias de <i>Apis mellifera</i> Africanizada</b> .....	27
<b>HIGHLIGHTS</b> .....	27
<b>GRAPHICAL ABSTRACT</b> .....	28
<b>RESUMO</b> .....	29
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	30
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
2.1. OBTENÇÃO DAS LARVAS DE <i>A. mellifera</i> AFRICANIZADA E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO .....	33
2.2. COMPOSIÇÃO E ELABORAÇÃO DA DIETA LARVAL .....	34
2.3. PIRACLOSTROBINA E CONCENTRAÇÕES ESCOLHIDAS .....	35
2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	36
2.5. EXPOSIÇÃO REPETIDA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE PIRACLOSTROBINA .....	38
2.6. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO REPETIDA .....	39
2.7. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS INTESTINOS DE LARVAS E ADULTOS .....	39
2.8. PROCESSAMENTO DAS LÂMINAS PARA IMUNO-FLUORESCÊNCIA .....	39
<b>2.8.1. Detecção de morte celular pelo método do TUNEL</b> .....	40
<b>2.8.2. Marcação da matriz peritrófica (WGA-FITC)</b> .....	40
2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>3 RESULTADOS</b> .....	42
3.1. EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO PIRACLOSTROBINA .....	42
3.2. REAÇÃO DO TUNEL .....	43
3.3. QUANTIFICAÇÃO DO WGA-FITC .....	46
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53
<b>4 CAPÍTULO 2</b> .....	60
<b>Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees</b> ★ .....	61

<b>HIGHLIGHTS</b> .....	61
<b>GRAPHICAL ABSTRACT</b> .....	62
<b>ABSTRACT</b> .....	63
<b>1. Introduction</b> .....	64
<b>2. Materials and Methods</b> .....	66
2.1. <i>Fungicide</i> .....	66
2.2. <i>Toxicological bioassays</i> .....	67
2.2.1. Experimental design .....	67
2.2.2. Bioassays: newly emerged and forager bees .....	67
2.3. <i>Histological procedure of midguts</i> .....	68
2.4. <i>Semi-quantitative analysis of midguts (lesion index)</i> .....	68
2.5. <i>Histochemical quantification</i> .....	69
2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	69
<b>3. Results</b> .....	69
3.1. <i>Survival rate</i> .....	69
3.2. <i>Morphological analysis</i> .....	70
3.3. <i>Lesion index</i> .....	73
3.4. <i>Histochemistry analysis</i> .....	75
<b>4. Discussion</b> .....	77
<b>5. Conclusion</b> .....	82
<b>Author contribution</b> .....	82
<b>Declaration of competing interest</b> .....	82
<b>Acknowledgements</b> .....	83
<b>References</b> .....	83
<b>5 CAPÍTULO 3</b> .....	91
<b>Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee <i>Melipona scutellaris</i></b> .....	92
<b>HIGHLIGHTS</b> .....	92
<b>GRAPHICAL ABSTRACT</b> .....	93
<b>ABSTRACT</b> .....	94
<b>1. Introduction</b> .....	95
<b>2. Materials and Methods</b> .....	98
2.1. <i>Collection of stingless bees and toxicological bioassays</i> .....	98
2.2. <i>Processing of organs for light microscopy</i> .....	99
2.3. <i>Midgut histopathological analysis: Lesion index determination</i> .....	99
2.4. <i>Histochemical marking intensity on the midgut</i> .....	100



2.5. <i>Survival analysis and lethal mean time</i> .....	100
2.6. <i>Statistical analysis</i> .....	100
<b>3. Results</b> .....	101
3.1. <i>Lesion indexes and organ index</i> .....	101
3.2. <i>Morphological analysis and histochemical quantification</i> .....	103
3.3. <i>Survival pattern and median lethal time</i> .....	106
<b>4. Discussion</b> .....	108
<b>5. Conclusion</b> .....	113
<b>Acknowledgments</b> .....	114
<b>References</b> .....	114
<b>6 CAPÍTULO 4</b> .....	123
<b>Abordagem multifatorial para avaliar os efeitos da exposição ao acetamiprida em colônias de <i>Apis mellifera iberiensis</i> em plantações de <i>Eucalyptus</i></b> .....	124
<b>RESUMO</b> .....	124
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	125
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	129
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	129
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	130
3.1. SELEÇÃO DOS LOCAIS DE ESTUDO E INSTALAÇÃO DOS APIÁRIOS .....	130
3.2. MONITORAMENTO DOS ATRIBUTOS DAS COLÔNIAS DE <i>A. mellifera iberiensis</i> .....	132
3.2.2. <b>Demografia e quantidades de reservas</b> .....	134
3.2.3. <b>Estado sanitário: identificação e prevalência de agentes infecciosos</b> .....	138
3.3. APLICAÇÃO DE ACETAMIPRIDA (Epik SG®) E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO .....	139
3.3.1. <b>Medida de atividade de forrageamento</b> .....	140
3.4. AVALIAÇÃO DOS RECURSOS FLORAIS .....	141
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	143
<b>4 RESULTADOS</b> .....	144
4.1. CONDIÇÕES EXTERNAS E INTERNAS .....	144
4.2. MONITORAMENTO COM AS BALANÇAS AUTOMÁTICAS.....	144
4.3. DESENVOLVIMENTO DAS COLÔNIAS .....	145
4.4. ESTADO SANITÁRIO DAS COLÔNIAS.....	148
4.5. AVALIAÇÃO DE MULTIRESÍDUOS E DE ACETAMIPRIDA.....	148
4.6. FORRAGEAMENTO E RECURSOS FLORAIS.....	150
4.7. ANÁLISE PALINOLÓGICA DO PÓLEN E MEL COLETADOS .....	155

<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	160
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	164
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	165
<b>APÊNDICES</b> .....	175
<b>APÊNDICE 1</b> .....	175
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	176
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	178
<b>ANEXOS</b> .....	185
<b>ANEXO 1</b> .....	185
<b>ANEXO 2</b> .....	186
<b>ANEXO 3</b> .....	187

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre os serviços e processos ambientais fornecidos pela natureza (COSTANZA *et al.*, 1997; DAILY, 1997; BOYD; BANZHAF, 2007; COSTANZA *et al.*, 2017), a polinização é reconhecidamente importante na reprodução de espécies vegetais, garantindo a perpetuação e atuando na manutenção da biodiversidade no planeta Terra, o que representa muitos benefícios aos seres humanos (HEIN, 2009; OBUTE, 2010; COSTANZA *et al.*, 2017). Atrelado aos serviços ecossistêmicos, a polinização tem grande relevância e importância na produção de alimentos. Inúmeros trabalhos atribuíram valores ao serviço de polinização (COSTANZA *et al.*, 1997; GALLAI *et al.*, 2009; HANLEY *et al.*, 2015), sendo o mais recente com estimativas em torno de 235 a 577 bilhões de dólares/ano (IPBES, 2016). No Brasil, os valores se aproximam de 12 bilhões de dólares, que representa a renda total das culturas dependentes de polinizadores (GIANNINI *et al.*, 2015a).

Segundo levantamento realizado por Ollerton, Winfree e Tarrant (2011), os cálculos aproximados demonstraram que 308.006 espécies de angiospermas são polinizadas por animais, o que representa 87,5% da diversidade de espécies vegetais com flores estimadas por Paton *et al.* (2008). Embora exista uma ampla variedade de animais polinizadores como borboletas (REDDI; BAI, 1984), mariposas (HAHN; BRUHL, 2016), moscas (SSYMANK *et al.*, 2008), besouros (COSTA *et al.*, 2017), aves (DELLINGER *et al.*, 2014) e mamíferos (CARTHEW; GOLDINGAY, 1997; SAZIMA; BUZATO; SAZIMA, 1999), as abelhas representam o maior grupo dos polinizadores (HUNG *et al.*, 2018).

As abelhas, exercem um papel ecológico extremamente importante, uma vez que seus serviços ecossistêmicos de polinização contribuem para a manutenção da estrutura e funcionamento de grande parte dos ecossistemas naturais (KLEIN *et al.*, 2007; HUNG *et al.*, 2018). Adicionalmente, elas têm um papel econômico na produção de plantas cultivadas (IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010), já que a polinização realizada por abelhas proporciona maior quantidade e melhor qualidade dos frutos, menores taxas de malformações, maior vida útil e consequentemente maior valor comercial (KLATT *et al.*, 2014) e, também, são reconhecidas economicamente pela comercialização de produtos apícolas como mel, própolis, geleia real, cera, pólen e seu veneno (SCHMIDT, 1997).

Com ocorrência em uma grande diversidade de áreas geográficas, a espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) é reconhecidamente um polinizador de alto valor econômico (HUNG *et al.*, 2018). Por suas características generalistas, fornecem os serviços de polinização para uma ampla diversidade de culturas agrícolas e geram valor por meio da

comercialização de produtos apícolas, uma vez que são facilmente manejadas (GARY *et al.*, 1985; KLEIN *et al.*, 2007). No Brasil, as abelhas Africanizadas *A. mellifera* são resultantes do cruzamento de subespécies europeias (italiana, alemã e austríaca) com uma subespécie africana (KERR, 1967; DE JONG, 1996) e exibem enorme relevância na polinização de diversos tipos de culturas agrícolas como, por exemplo, melão e maçã (SILVA; PACHECO FILHO; FREITAS, 2015), café, caju, citros, pitanga, manga, girassol e algodão (GIANNINI *et al.*, 2015b). Ainda nesse sentido, seus serviços de polinização podem incrementar a produção de espécies que não dependem da polinização por insetos como é o caso da soja (CHIARI *et al.*, 2005; CHIARI *et al.*, 2008).

Por outro lado, o Brasil apresenta uma rica abundância de diversidade de espécies nativas “sem ferrão” (MICHENER, 2007; PEDRO, 2014), que baseado em diferentes características biológicas das espécies podem ser implementadas como uma alternativa promissora na polinização em diferentes culturas agrícolas (SILVA; PACHECO FILHO; FREITAS, 2015). Esse é o caso da espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811), que consegue realizar a polinização por vibração (*buzz pollination*) no momento da coleta do pólen das flores, visto que utilizam sua musculatura torácica (músculos longitudinais e verticais) para produzir vibrações nas anteras e com isso liberar o pólen (BUCHMANN; HURLEY, 1978; NUNES-SILVA; HRNCIR; IMPERATRIZ-FONSECA, 2010). Entretanto, a grande importância destas espécies se dá pela sua imprescindibilidade na polinização da flora nativa, que é vital na reconstrução de florestas tropicais e de suma relevância para a manutenção da biodiversidade de ecossistemas no país (KERR, 1997; BALLIVIAN, 2008; IMPERATRIZ-FONSECA; NUNES-SILVA, 2010; SILVA; PAZ, 2012).

Contudo, a degradação e fragmentação de habitats naturais, associada a contínua expansão de monoculturas, que leva a escassez de diversidade de recursos florais e o intenso uso de agrotóxicos, vem prejudicando as populações de abelhas (GOULSON *et al.*, 2015). Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos relataram a perda acentuada de colônias de abelhas *A. mellifera* em diferentes continentes (vanENGELSDORP *et al.*, 2008; POTTS *et al.*, 2010; vanENGELSDORP *et al.*, 2011; BRODSCHNEIDER *et al.*, 2018), que ficou conhecida mundialmente como *Colony Collapse Disorder* (CCD) (COX-FOSTER *et al.*, 2007; ELLIS; EVANS; PETTIS, 2010; NEUMANN; CARRECK, 2010). Há evidências que as causas da CCD possam estar relacionadas com a combinação e interação de múltiplos fatores estressores (GOULSON *et al.*, 2015). No Brasil, também há relatos do declínio das populações de abelhas (CARVALHO *et al.*, 2012; PIRES *et al.*, 2016) e os riscos não

somente se aplicam à espécie exótica manejada *A. mellifera*, mas também às espécies nativas (van der VALK *et al.*, 2012).

Segundo Ferreira *et al.* (2012), aproximadamente um terço do território brasileiro está destinado para a produção agrícola, representando uma ameaça as abelhas pela fragmentação dos habitats e pela exposição aos agrotóxicos. De acordo com o dossiê ABRASCO (2015), 70% dos alimentos *in natura* consumidos no Brasil contêm resíduos de agrotóxicos. No entanto, não há um estudo sistematizado no Brasil em relação a concentração de agrotóxicos presentes no pólen e néctar das plantas cultivadas que são visitadas por abelhas.

Os inseticidas são agrotóxicos amplamente estudados e vários trabalhos demonstraram os efeitos adversos em larvas e operárias adultas de *A. mellifera* (ROAT *et al.*, 2014; TAVARES *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2017; FRIOL *et al.*, 2017; ROAT *et al.*, 2017; TAVARES *et al.*, 2019; BALSAMO *et al.*, 2019) e abelhas nativas sem ferrão (LOURENÇO *et al.*, 2012; JACOB *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2015; MARIANO *et al.*, 2016; DORIGO *et al.*, 2019). Apesar disso, segundo Heimbach *et al.* (2017) estudos que avaliem a exposição aos inseticidas em escalas de paisagem ainda são limitados, embora resíduos destes agrotóxicos sejam encontrados em matrizes apícolas (NIELL *et al.*, 2017).

Detectado em concentrações residuais no ambiente, o inseticida acetamiprida pertencente aos grupos dos neonicotinóides, que são os agrotóxicos mais utilizados e comercializados em todo o mundo (BASS *et al.*, 2015; HAN; TIAN; SHEN, 2017). O mecanismo de ação deste grupo ocorre pela ligação aos receptores nicotínicos de acetilcolina, localizados nos neurônios pós-sinápticos, onde a enzima acetilcolinesterase não consegue degradar rapidamente essas moléculas, causando hiperexcitação do sistema nervoso central, paralisia e morte do inseto (TOMIZAWA; CASIDA, 2003; GYORI *et al.*, 2017). Atualmente no Brasil, é encontrado em 34 produtos formulados, livre ou associados a outras moléculas, que são utilizados em plantações de eucaliptos e em culturas agrícolas como maçã, mamão, melão e tomate (MAPA, 2021).

Alguns estudos destacam os efeitos prejudiciais de concentrações subletais de acetamiprida em abelhas *A. mellifera*, como redução da longevidade, alteração na atividade de forrageamento (SHI *et al.*, 2020) e no comportamento (EL HASSANI *et al.*, 2008). Wang, Zhu e Li (2020) demonstraram potencial sinérgico de acetamiprida com outros agrotóxicos e os efeitos tóxicos da mistura. Entretanto, estudos que contemplem os efeitos da exposição ao acetamiprida em escala de campo são escassas.

Em relação a quantidade de estudos entre agrotóxicos, pesquisas utilizando os fungicidas não apresentaram o mesmo crescimento nas últimas décadas quando comparado com os inseticidas (WOOD; GOULSON, 2017; CULLEN *et al.*, 2019), embora em algumas culturas agrícolas e no seu entorno, os fungicidas são encontrados em maior quantidade (PETTIS *et al.*, 2013; PARK *et al.*, 2015; DAVID *et al.*, 2016). Adicionalmente, o risco da exposição das abelhas aos fungicidas é aumentado em condições realísticas, o que torna preocupante a escassez de estudos do efeito dos fungicidas em abelhas.

O piraclostrobina é um fungicida pertencente ao grupo das estrobilurinas, que representa o segundo maior grupo em vendas no mercado mundial (MORTON; STAUB, 2008). O mecanismo de ação dos fungicidas estrobilurinas ocorre por meio da inibição da respiração de fungos e demais eucariotos (BARTLETT *et al.*, 2002; PARREIRA; NEVES; ZAMBOLIM, 2009). No Brasil, o piraclostrobina pode ser encontrado em 24 produtos formulados no mercado, na sua forma livre ou associado a outros ingredientes ativos (MAPA, 2020). Das culturas agrícolas em que ele é utilizado, sete delas são polinizadas por *A. mellifera* Africanizada ou *M. scutellaris* (SILVA; PACHECO FILHO; FREITAS, 2015).

Segundo Battaglin *et al.* (2011), a interpretação de baixa toxicidade dos fungicidas estrobilurinas eram limitadas devido as lacunas de conhecimento. Indo ao encontro, Degrandi-Hoffman *et al.* (2015) demonstraram efeitos adversos do fungicida piraclostrobina em *A. mellifera* similares aos de má nutrição, o que pode comprometer a colônia tornando-a mais susceptíveis a doenças. Pettis *et al.* (2013) detectaram concentrações extremamente elevadas de piraclostrobina em amostras de pólen. Nesse contexto, a alimentação contendo resíduos do fungicida podem prejudicar a performance individual e conseqüentemente afetar a colônia.

Ao ingerir o alimento contendo resíduos de agrotóxicos, este será digerido e absorvido no intestino médio da abelha. Logo, por essa via de exposição, o intestino é o primeiro órgão a entrar em contato com o agrotóxico. O intestino dos insetos é dividido em três regiões principais (intestino anterior, médio e posterior), sendo o intestino médio responsável principalmente pela digestão e absorção de nutrientes (CRUZ-LANDIM; RODRIGUES, 1967; SERRÃO; CRUZ-LANDIM, 1996). Como hipótese da presente pesquisa, provavelmente, os sintomas de má nutrição observados por Degrandi-Hoffman *et al.* (2015) em abelhas expostas ao piraclostrobina possa estar relacionado às alterações morfofisiológicas no epitélio do intestino médio, o que estaria comprometendo a sua função.

Nesse contexto, como hipótese, considerando a importância ecológica e econômica das espécies *A. mellifera* Africanizada e *M. scutellaris* e uma vez que os fungicidas estão cada

vez mais presentes nas culturas agrícolas, é imprescindível analisar os efeitos destes agrotóxicos em ambas as espécies e comparar a sensibilidade e fornecer dados para futuros estudos de estimativa a sensibilidade entre diferentes espécies de abelhas. Nesse sentido, o estudo pretende adicionar informações importantes como forma de contribuir para proteção e manutenção das populações de duas importantes espécies de abelhas no país. Adicionalmente, considerando a utilização do inseticida acetamiprida em muitas culturas e em paisagens dominadas por eucaliptos, é muito relevante avaliar os efeitos da exposição deste inseticida em um cenário realístico como forma de suprir as lacunas de conhecimento ainda existentes.

Os resultados do presente estudo serão apresentados na forma de quatro artigos organizados em capítulos, dos quais dois já estão publicados e os outros dois estão em fase de envio para revistas científicas da área. Os três primeiros capítulos foram desenvolvidos no Brasil, com foco no fungicida piraclostrobina e o último capítulo foi desenvolvido em Portugal, como foco no inseticida acetamiprida.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar e comparar os efeitos de diferentes concentrações residuais do fungicida piraclostrobina em larvas, adultas recém-emergidas e forrageiras de *Apis mellifera* Africanizada (Linnaeus, 1758) e forrageiras de *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811), por meio de diferentes parâmetros de análise em escala individual e subindividual, bem como verificar os efeitos da exposição ao inseticida acetamiprida nas colônias de *A. mellifera iberiensis*, em paisagens dominadas por plantações de eucaliptos por meio de parâmetros multifatoriais.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

- Verificar se a exposição durante a fase larval ao piraclostrobina causa alterações na mortalidade larval, taxa de pupação e emergência de *A. mellifera* Africanizada e analisar os possíveis efeitos tardios por meio de estudos imuno-histoquímicos.
- Investigar a presença de morte celular no epitélio do intestino de larvas e adultos expostos na fase larval, por meio da reação do TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling*), no microscópio confocal de varredura a laser.
- Quantificar a quitina na matriz peritrófica do intestino de larvas e adultos expostos na fase larval, por meio da técnica do WGA (*Wheat Germ Agglutinin*) conjugado com FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) utilizando a microscopia confocal de varredura a laser.
- Determinar o tempo de sobrevivência de abelhas recém-emergidas e forrageiras de *A. mellifera* Africanizada e de forrageiras de *M. scutellaris*.
- Analisar os efeitos tardios da exposição oral contínua ao fungicida piraclostrobina na histoarquitetura do intestino médio e determinar o índice de lesão em abelhas recém-emergidas e forrageiras de *A. mellifera* Africanizada e forrageiras *M. scutellaris*.



- Quantificar a intensidade de marcação de macromoléculas orgânicas por meio de análises histoquímicas no intestino médio de abelhas recém-emergidas e forrageiras de *A. mellifera* Africanizada e forrageiras de *M. scutellaris*.
- Investigar a toxicidade do inseticida acetamiprida para as colônias de *A. mellifera iberiensis* após exposição em campo, verificando possíveis alterações na saúde e no desenvolvimento ao longo do monitoramento, quando comparadas com as colônias de uma paisagem controle.
- Identificar por meio de análises palinológicas as espécies botânicas mais utilizadas como recursos pelas colônias nas paisagens dominadas por eucaliptos.
- Verificar e quantificar a presença de resíduos de acetamiprida no *bee bread*, pólen e nectar nas colônias, previamente e posteriormente a aplicação.

### **3 CAPÍTULO 1**

A pesquisa referente a este capítulo foi conduzida no Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental (LEIA) do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Abelhas (NuPECA) da Universidade Federal de São Carlos (câmpus de Sorocaba). O manuscrito referente a este capítulo será submetido para publicação em revista científica especializada na área de ecotoxicologia.

## **Efeitos da exposição larval ao fungicida piraclostrobina no desenvolvimento pós-embrionário de operárias de *Apis mellifera* Africanizada**

Caio Eduardo da Costa Domingues<sup>a\*</sup>; Rafaela Tadei<sup>b</sup>; Lais Vieira Bello Inoue<sup>a</sup>; Elaine Cristina Mathias da Silva-Zacarin<sup>b\*</sup>; Osmar Malaspina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP) - “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências (IB), Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Rio Claro, SP, Brasil

<sup>b</sup>Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Biologia (DBio), Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental (LEIA), Sorocaba, SP, Brasil

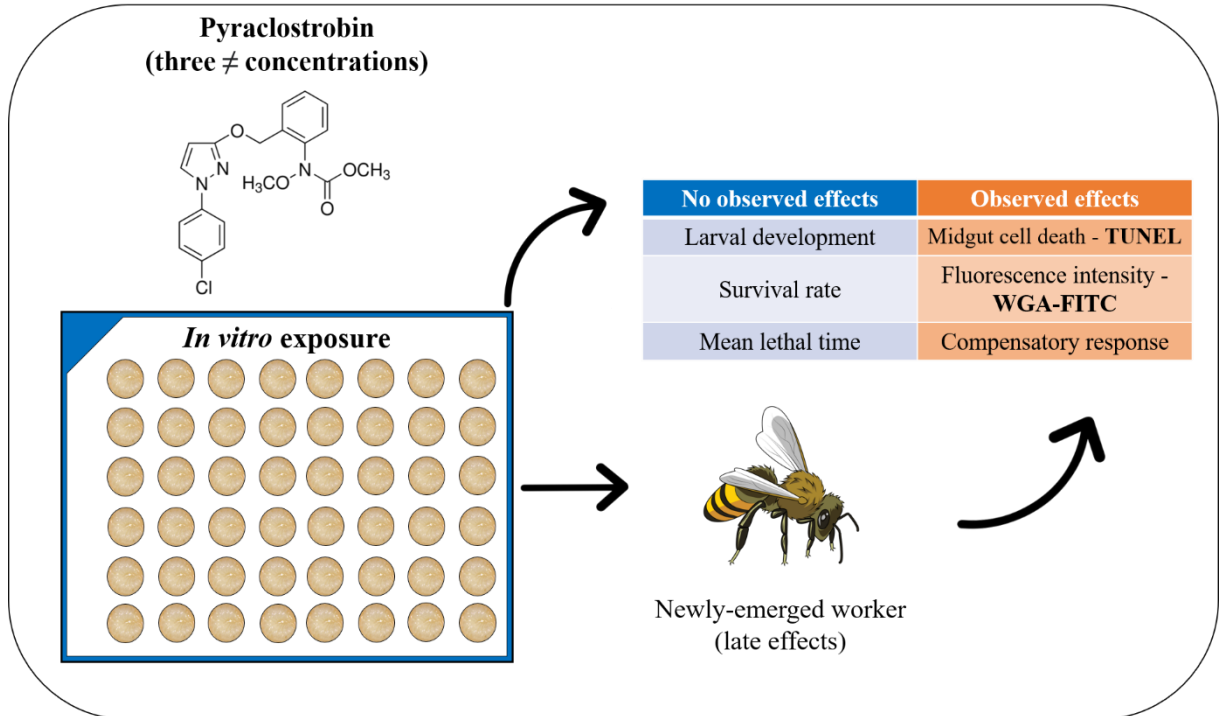
### **\*Autor correspondente:**

Caio Eduardo da Costa Domingues, UNESP - CEIS, Avenida 24 A, nº 1515, Jardim Bela Vista, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brasil. Email: [cecdomingues@gmail.com](mailto:cecdomingues@gmail.com) (C.E.C. Domingues).

### **HIGHLIGHTS**

- A mortalidade larval, taxa de pupação e emergência não foram alteradas pela exposição ao fungicida.
- Efeitos adversos em nível celular foram observados no intestino de larvas e abelhas adultas.
- A exposição ao piraclostrobina na fase larval evidenciou maior intensidade de marcação de quitina na matriz peritrófica.
- O piraclostrobina pode induzir respostas tardias em larvas e adultos de *Apis mellifera* Africanizada.
- O fungicida pode prejudicar a saúde e a performance da colônia.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## RESUMO

Entre as mais de vinte mil espécies de abelhas descritas atualmente, *Apis mellifera* se destaca por sua grande relevância econômica devido a polinização em culturas agrícolas. Nas últimas décadas, muitos estudos registraram o declínio nas populações associando múltiplos fatores envolvidos, como os agrotóxicos. Estas moléculas podem chegar por meio de resíduos presentes no néctar e pólen, que podem ser ingeridos pelas larvas. Contudo, são raros os estudos que contemplem os efeitos dos fungicidas em larvas e adultos. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da exposição ao piraclostrobina na fase larval e verificar os efeitos tardios em abelhas recém-emergidas. As larvas foram submetidas a exposição repetida (terceiro ao sexto dia do bioensaio) e as concentrações do piraclostrobina utilizadas foram de 911,25 ng/mL (PT1), 94,06 ng/mL (PT2) e 30,25 ng/mL (PT3). Os efeitos na mortalidade larval, taxa de pupação e emergência foram avaliados, assim como a taxa de sobrevivência e tempo letal médio das abelhas operárias recém-emergidas. Além disso, avaliamos a morte celular e a marcação de quitina da matriz peritrófica (MP) no intestino de larvas e recém-emergidas. Não foram observados efeitos adversos no desenvolvimento pós-embrionário das larvas e no tempo de sobrevivência das operárias recém-emergidas, evidenciando tolerância ao fungicida. Entretanto, o epitélio do intestino de larvas (PT1 e PT2) e adultas (PT1) apresentaram marcações positivas para morte celular e aumento da intensidade de marcação de quitina da matriz peritrófica, demonstrando efeito tardio do fungicida piraclostrobina. Desta forma, a ingestão do fungicida na fase larval pode prejudicar o desenvolvimento das abelhas e consequentemente prejudicar a saúde e performance da colônia. Nessa perspectiva, estudos que considerem os efeitos de fungicidas nas diferentes fases do desenvolvimento das abelhas são cruciais para melhor interpretação dos riscos de exposição.

**Palavras-chave:** Abelha Africanizada. Efeitos tardios. Intestino. Matriz peritrófica. Morte celular.

## 1 INTRODUÇÃO

A importância econômica da espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) para culturas agrícolas e sua relevância ecológica para os ecossistemas é reportada em diferentes estudos (MORSE; CALDERONE, 2000; RADER *et al.*, 2009; CALDERONE, 2012; RUCKER; THURMAN; BURGETT, 2012; GARIBALDI *et al.*, 2017; HUNG *et al.*, 2018). Entretanto, o uso intensivo de agrotóxicos nas culturas, associado a múltiplos fatores estressores, tem provocado o declínio de suas populações em diferentes países (NEUMANN; CARRECK, 2010; SANCHEZ-BAYO; GOKA, 2014; SIMON-DELISO *et al.*, 2014; GOULSON *et al.*, 2015).

Dentre a grande diversidade de agrotóxicos utilizados, os inseticidas são extensivamente estudados, com destaque para a classe dos neonicotinóides (BLACQUIÈRE *et al.*, 2012; FAIRBROTHER *et al.*, 2014; LUNDIN *et al.*, 2015). Contudo, vários estudos relacionaram efeitos adversos em abelhas após exposição aos fungicidas, na qual podemos destacar alteração na resposta imune (DEGRANDI-HOFFMAN *et al.*, 2015; CIZELJ *et al.*, 2016) e comportamental (TADEI *et al.*, 2019), diminuição da sobrevivência de indivíduos adultos e lesões no intestino médio (DOMINGUES *et al.*, 2020a; DOMINGUES *et al.*, 2020b; CARNEIRO *et al.*, 2020; BATISTA *et al.*, 2020), comprometimento do voo (LIAO *et al.*, 2019) e enfraquecimento da colônia (YODER *et al.*, 2013). Apesar dos estudos já realizados, Cullen *et al.* (2019) destacam que ainda existem lacunas de conhecimento que precisam ser sanadas em relação aos efeitos dos fungicidas nas abelhas, garantindo melhor gestão nos sistemas agrícolas e conseqüentemente diminuição no risco de exposição.

Até o presente momento, estudos que contemplem os efeitos da exposição dos fungicidas nas larvas de *A. mellifera* ainda são extremamente limitados (TADEI *et al.*, 2019; TADEI *et al.*, 2020) quando comparados com outras classes de agrotóxicos (GREGORC; BOWEN, 2000; CRUZ *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2017; FRIOL *et al.*, 2017; DAI *et al.*, 2018; TAVARES *et al.*, 2019). Esse cenário pode representar um risco para a colônia, uma vez que resíduos de fungicidas encontrados em pólen (PETTIS *et al.*, 2013; ZIOGA *et al.*, 2020) e no *bee bread* (KUBIK *et al.*, 1999; TONG *et al.*, 2018), podem ser estocados nos alvéolos, expondo as larvas por contato e principalmente por meio da ingestão do alimento contendo estes resíduos (WU; ANELLI; SHEPPARD, 2011).

Diante dessa realidade de exposição, o intestino demonstra ser um órgão de grande relevância, uma vez que participa diretamente da rota de absorção e metabolização do

alimento após a sua ingestão (SERRÃO; CRUZ-LANDIM, 1996; SILVA-ZACARIN *et al.*, 2011). O sistema digestório das abelhas é dividido em três regiões bem definidas: estomodeo ou intestino anterior, ventrículo ou intestino médio e o proctodeo ou intestino posterior (CRUZ-LANDIM; RODRIGUES, 1967). Por ser a região onde ocorre a digestão dos nutrientes e absorção, o intestino médio é muito analisado em estudos toxicológicos com larvas (CRUZ *et al.*, 2010; GREGORC; ELLIS, 2011) e adultos de *A. mellifera* (CATAE *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2020; DOMINGUES *et al.*, 2020a).

É importante destacar que, os órgãos das larvas exibem características e adaptações próprias desta fase e, durante o processo de metamorfose, passam por uma intensa remodelação tecidual até a emergência do indivíduo adulto (CRUZ-LANDIM, 2009). Tadei *et al.* (2019) descreveram efeitos tardios no comportamento das abelhas adultas (recém-emergidas) após exposição na fase larval aos agrotóxicos clotianidina e piraclostrobina, ministrados de forma isolada e combinada. Tais alterações poderiam não ser observadas, se as abelhas adultas não fossem estudadas após a exposição larval. Ainda nesse sentido, alguns trabalhos demonstraram maior tolerância das larvas aos agrotóxicos (TAVARES *et al.*, 2015; FRIOL *et al.*, 2017; TAVARES *et al.*, 2019; TADEI *et al.*, 2020), mas os mecanismos totais dessa tolerância ainda permanecem desconhecidos.

Atualmente, acredita-se na influência do corpo gorduroso nas respostas aos agrotóxicos devido suas funções de regulação da composição química da hemolinfa, metabolização de xenobióticos e pela grande quantidade deste tecido na fase larval (CRUZ-LANDIM, 1985; ABDALLA; DOMINGUES, 2015). De forma complementar ao corpo gorduroso, uma hipótese para tentar elucidar essa maior tolerância pode estar relacionada pela presença da matriz peritrófica (MP). Essa matriz extracelular reveste, internamente, o intestino médio das abelhas e pode ter diferenças estruturais e funcionais na larva e no indivíduo adulto, sendo uma barreira eficiente à ação de agrotóxicos na larva pelo fato dela acumular as fezes durante todo o desenvolvimento larval e defecar somente na passagem da fase de larva para pupa (CHAPMAN, 2013).

A MP é uma camada extracelular semipermeável composta por fibrilas de quitina associada com glicoproteínas. Ela forma um envelope ao redor das fezes presentes no lúmen do intestino médio dos insetos, separando o conteúdo luminal em dois compartimentos funcionais: os espaços endoperitrófico e ectoperitrófico (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996). A MP desempenha um papel importante na digestão e absorção de nutrientes, uma vez que sua permeabilidade e porosidade permite o movimento seletivo de moléculas, tais como

enzimas digestivas, no espaço endoperitrófico (HEGEDUS *et al.*, 2009). A MP também atua como uma barreira limitante aos patógenos e protege as microvilosidades celulares da abrasão durante a digestão (LEHANE, 1997; TELLAM; WIJFFELS; WILLADSEN, 1999). O balanço entre a síntese e degradação da MP dos insetos, que ocorre por meio da ação das quitinases e quitina-sintases, determina a sua espessura e as peritrofinas estão envolvidas na sua elasticidade e permeabilidade (SHAO; DEVENPORT; JACOBS-LORENA, 2001).

Diante do exposto, o presente estudo pretende sanar as lacunas de conhecimento dos efeitos do fungicida a fim de verificar se existem alterações nos padrões normais de desenvolvimento de larvas e adultas recém-emergidas. Portanto, o objetivo do trabalho é avaliar e comparar os efeitos subletais da exposição na fase larval ao fungicida piraclostrobina por meio de parâmetros biológicos ao longo do desenvolvimento pós-embrionário, bem como o diagnóstico de morte celular no epitélio do intestino médio e avaliação da marcação de quitina na matriz peritrófica de larvas e adultos expostos.



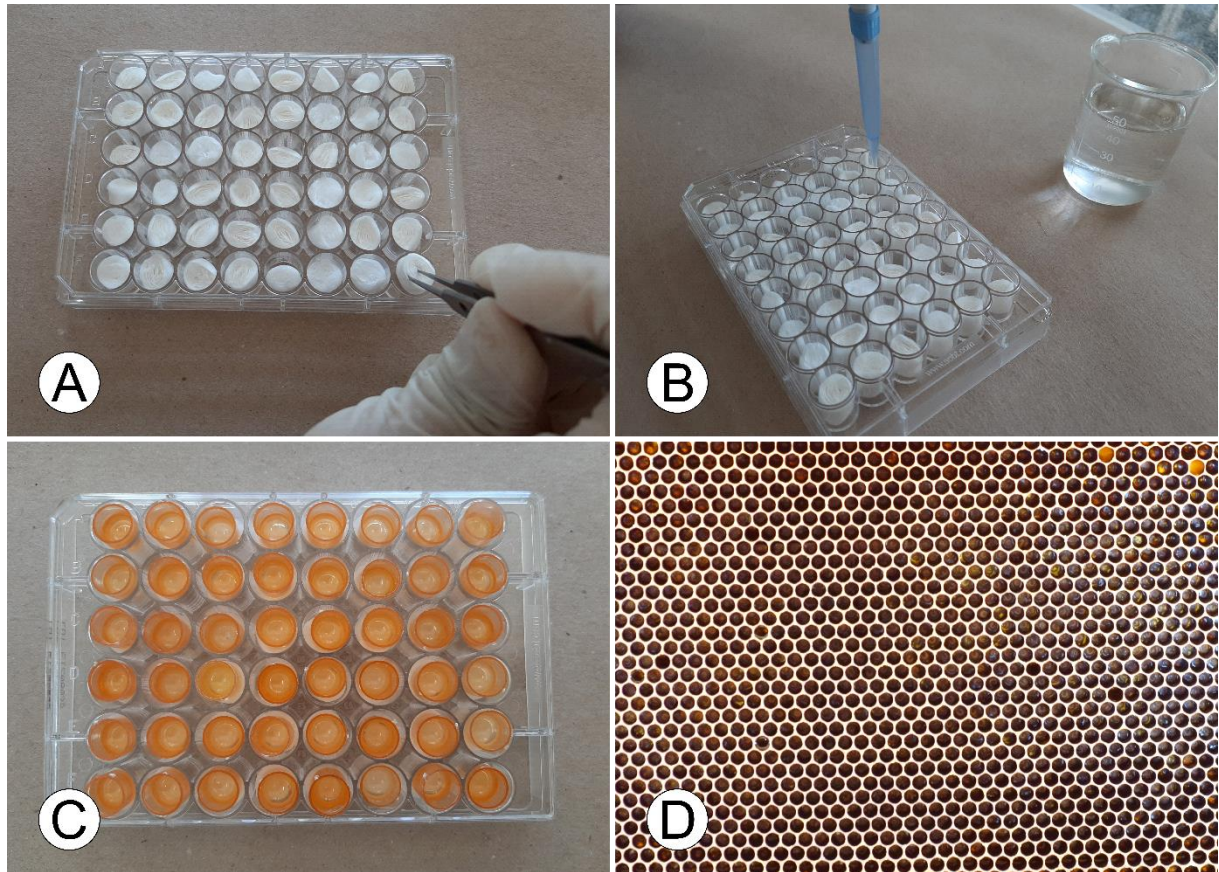
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. OBTENÇÃO DAS LARVAS DE *A. mellifera* AFRICANIZADA E MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO

Para a realização dos bioensaios, três colônias não parentais com estado fisiológico conhecido e sem sintomas visíveis de doenças e parasitas foram selecionadas do apiário, localizado na área rural de Piedade - São Paulo (23° 37' 5.506" S; 47° 29' 7.926" W). Todas as colônias foram previamente monitoradas mensalmente e nenhum tratamento foi aplicado antes de sua utilização nos bioensaios. Inicialmente, foi adicionado um quadro limpo de cera alveolada no interior de cada uma das três colônias, com o objetivo de induzir a oviposição da rainha e assim obter quantidades suficientes de larvas de primeiro instar. Após o desenvolvimento embrionário de três dias das larvas, os favos de cria foram coletados das três colônias, entre o período das 8:00 - 9:00 horas da manhã e com temperaturas iguais ou superiores a 15 °C, e transportados até o Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental (LEIA) da Universidade Federal de São Carlos em Sorocaba - São Paulo. Todos os procedimentos experimentais utilizados foram realizados conforme o protocolo OECD n° 239 (2016).

No laboratório, utilizando pinças (n° 0), as larvas de primeiro instar foram individualmente transferidas dos favos de cria para cúpulas de poliestireno (1 x 1 x 1 cm), previamente esterilizadas, contendo 20 µL de dieta artificial A (50% solução açucarada contendo D-glucose, D-fructose, extrato de levedura e 50% geleia real, m/m) (AUPINEL *et al.*, 2005). As cúpulas foram dispostas em placas de cultura celular com 48 poços, sendo que cada poço foi previamente preenchido com metade de algodão dental embebido em 500 µL de solução esterilizante contendo 15% m/v de glicerol e 0,2% m/v de solução de cloreto de metilbenzetônio (MBC) (Figura 1). Após a transferência, a viabilidade de cada larva foi verificada pela observação em estereomicroscópio de luz fria (Leica EZ4 HD), onde as larvas mortas ou submersas no alimento foram substituídas por outras de uma placa reserva.

**FIGURA 1** - Preparação dos bioensaios com larvas de *A. mellifera* Africanizada. **A** - Algodões dentais sendo colocados na placa de cultura celular. **B** - Algodões embebidos em solução esterilizante. **C** - Cúpulas dos bioensaios sendo alocadas na placa de cultura celular. **D** - Padrão de quadro utilizado para transferência das larvas de primeiro instar para as cúpulas de bioensaios.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As placas contendo as larvas nas cúpulas foram acondicionadas no interior de uma caixa hermética de acrílico (Nalgene<sup>®</sup> 5317-0070, 178 x 305 x 305 mm) contendo uma bandeja com solução aquosa saturada de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) para manutenção da umidade relativa em torno de  $95 \pm 5\%$ . A caixa hermética foi mantida dentro de uma estufa incubadora a  $34 \pm 2^\circ C$  e ausência de luz. Para a manutenção da umidade no interior da estufa incubadora, uma bandeja contendo solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) foi adicionada.

## 2.2. COMPOSIÇÃO E ELABORAÇÃO DA DIETA LARVAL

Para o preparo dos três tipos de dietas larvais (A, B e C) (AUPINEL *et al.*, 2005) utilizou-se na composição D-glucose (99,5%, G8270, Sigma-Aldrich), D-fructose (99%, F0127, Sigma-Aldrich), extrato de levedura (70161, Sigma-Aldrich) e geleia real pura *in natura* (APACAME). A concentração de cada um destes componentes variou de acordo com

as fases do desenvolvimento larval, onde há diferentes exigências nutricionais como demonstrado na tabela 1 (AUPINEL *et al.*, 2005).

**TABELA 1** - Composição da dieta artificial larval e concentração dos ingredientes utilizados na criação *in vitro* de operárias de *A. mellifera* Africanizada.

Constituintes da Dieta	Diets e concentrações dos ingredientes		
	A	B	C
D-glucose	12%	15%	18%
D-fructose	12%	15%	18%
Extrato de levedura	2%	3%	4%
Geleia real	50%	50%	50%

**Fonte:** Adaptado de Aupinel *et al.*, (2005).

Os componentes da dieta larval foram diluídos em solução aquosa autoclavada (água destilada), e posteriormente filtrados com seringa utilizando um filtro milipore (*non-pyrogeninc* 0,20  $\mu\text{m}$  - Sterile-R). A solução açucarada e a geleia real foram misturadas com agitação suave no momento da alimentação e fornecidas individualmente com o auxílio de uma micropipeta para líquidos viscosos. O tipo de dieta, a quantidade de alimento fornecido e a frequência da alimentação das larvas estão descritos na tabela 2. No segundo dia do bioensaio, as larvas não foram alimentadas devido ao período necessário para aclimação em condições laboratoriais (AUPINEL *et al.*, 2005).

**TABELA 2** - Tipo de dieta, quantidade diária ( $\mu\text{L}$ ) e frequência de alimentação das larvas operárias de *A. mellifera* Africanizada em condições laboratoriais. **Legenda:** (-) = ausência de alimentação devido ao período de aclimação.

	Dias					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
<b>Tipo de dieta</b>	A	-	B	C	C	C
<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	20	-	20	30	40	50

**Fonte:** Adaptado de Aupinel *et al.* (2005).

### 2.3. PIRACLOSTROBINA E CONCENTRAÇÕES ESCOLHIDAS

O fungicida piraclostrobina *analytical standard*, adquirido da Sigma-Aldrich (CAS Number 175013-18-0, 99,9% pureza), foi utilizado nos bioensaios larvais. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de 1000 ng i.a./mL utilizando como solvente, água destilada e acetona, na proporção de 60% - 40%, a qual foi diluída de forma seriada até atingir as concentrações de trabalho do presente estudo, necessários para os bioensaios de exposição

oral. Como o piraclostrobina não é totalmente solúvel em água, a acetona foi escolhida como solvente orgânico e um grupo desse solvente foi adicionado como controle da acetona (item 2.4).

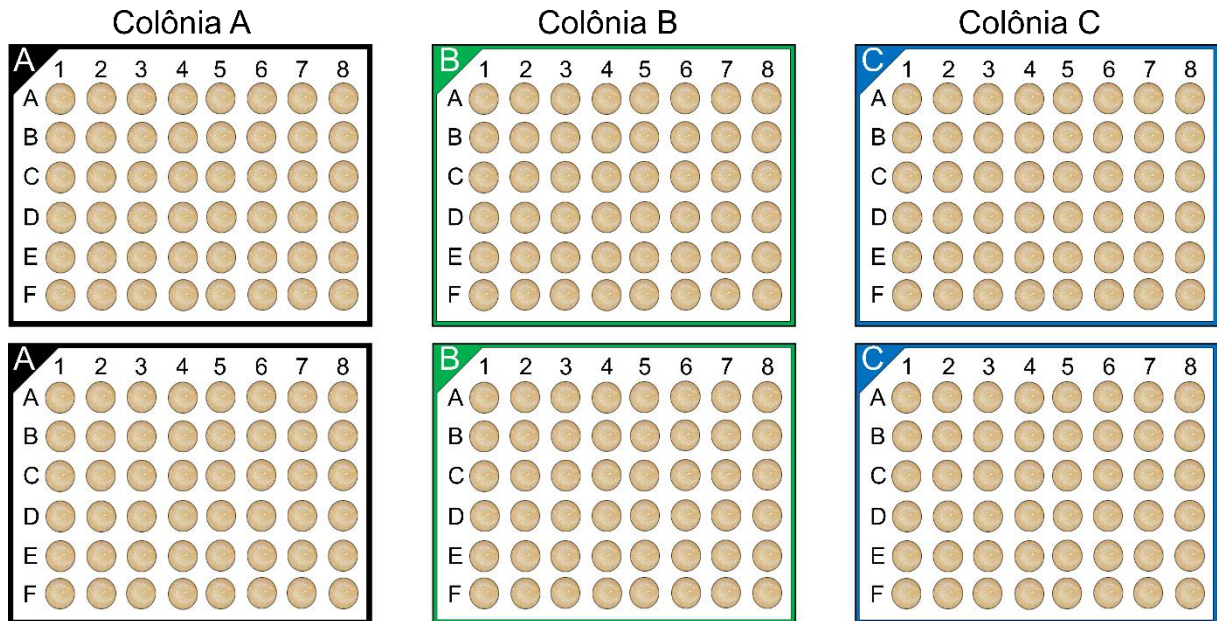
A escolha das concentrações foi baseada em resíduos do piraclostrobina encontrados no pólen coletado pelas abelhas forrageiras, na faixa de  $2.787,1 \pm 1.890,1$  (27.000, máximo) ng/g (PETTIS *et al.*, 2013), como também em amostras de *bee bread* coletados da colônia (2170 ng/g - 319 ng/g) (YODER *et al.*, 2013) e, também, baseados em experimentos com larvas já conduzidos *in vitro* ( $169 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (TADEI *et al.*, 2019).

#### 2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No início dos bioensaios de exposição repetida, as larvas foram divididas nos seguintes grupos experimentais: controle (CT), controle acetona (AC), piraclostrobina 911,25 ng/mL (PT1), piraclostrobina 94,06 ng/mL (PT2), piraclostrobina 30,25 ng/mL (PT3) e o dimetoato (DMT, *intake* de 7,420 ng/larva) como químico de referência estabelecido para *A. mellifera* (OECD, 2016), totalizando seis grupos experimentais.

Para realização do bioensaio foram utilizadas 48 larvas por grupo experimental, distribuídas em seis placas, sendo 16 larvas para cada uma das três colônias selecionadas (A, B e C) como evidenciado na figura 2. Esse procedimento foi realizado em triplicata, isto é, foram utilizadas 144 larvas por grupo experimental distribuídas em 18 placas, cumprindo em quatro vezes as exigências mínimas da OECD nº 239 (2016), de 36 larvas por grupo experimental (12 larvas x 3 colônias = 36).

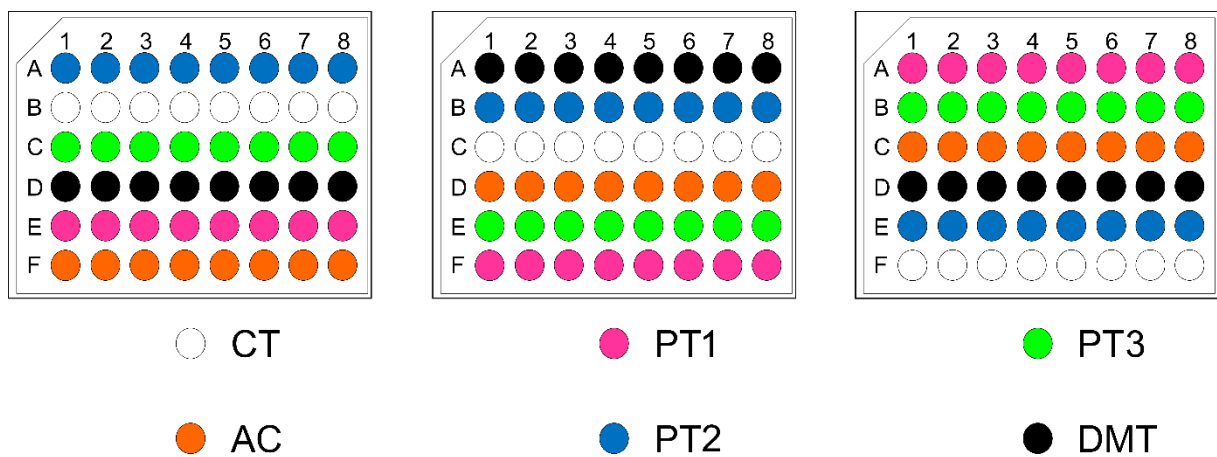
**FIGURA 2** - Organização das três colônias utilizadas nos bioensaios laboratoriais com larvas de *A. mellifera* Africanizada.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Para garantir a diversidade de distribuição das larvas nas cúpulas individuais, cada placa continha todos os grupos experimentais separados de forma a variar essa organização em cada uma das 18 placas utilizadas nos bioensaios (Figura 3). Isso nos proporciona uma grande heterogeneidade das placas, garantindo maior precisão e confiabilidade dos dados coletados, evitando as possíveis alterações que podem ocorrer no microambiente de cada placa.

**FIGURA 3** - Esquema demonstrando a distribuição casual de todos os grupos experimentais nas placas utilizadas nos bioensaios larvais com *A. mellifera* Africanizada. **Legenda:** CT = Controle, AC = Controle acetona, PT1 = Piraclostrobina 911,25 ng/mL, PT2 = Piraclostrobina 94,06 ng/mL, PT3 = Piraclostrobina 30,25 ng/mL, DMT = Dimetoato.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 2.5. EXPOSIÇÃO REPETIDA PARA AS CONCENTRAÇÕES DE PIRACLOSTROBINA

No período da exposição repetida, do D3 ao D6 do bioensaio após a transferência das larvas, as diferentes concentrações do piraclostrobina foram misturadas a dieta larval e as larvas foram expostas por via oral. As larvas do grupo AC receberam em sua dieta larval o mesmo volume de acetona dos grupos PT1, PT2 e PT3, não excedendo 2% do volume final da dieta durante o período do D3 ao D6 conforme determina a OECD nº 239 (2016). O grupo CT recebeu a dieta larval (50% solução açucarada e 50% geleia real, m/m) sem adição do fungicida e do solvente acetona.

As concentrações de piraclostrobina utilizadas na dieta larval foram calculadas segundo o consumo total de pólen durante a fase de alimentação larval de 5,4 mg (SIMPSON, 1955; BABENDREIER *et al.*, 2004; SIMON-DELSO *et al.*, 2017; TADEI *et al.*, 2019) e baseado no valor do fungicida piraclostrobina encontrado no pólen. Dessa forma, as concentrações de trabalho selecionadas apresentaram os seguintes consumos por larva (*intake*): PT1 - 911,25 ng/mL (*intake* de quatro dias: 127,58 ng/larva) representando o pior cenário encontrado no pólen (27.000 ng/g), PT2 - 94,06 ng/mL (*intake* de quatro dias: 13,16 ng/larva) e PT3 - 30,27 ng/mL (*intake* de quatro dias: 4,24 ng/larva) representando concentrações frequentes de serem encontradas no campo, 2.787 ng/g e 897 ng/g respectivamente. O *intake* foi calculado fundamentado no consumo total da dieta larval durante o período de exposição repetida de quatro dias (D3 ao D6) e com base na concentração do fungicida na dieta fornecida (Tabela 3).

**TABELA 3** - Cálculo do *intake* total durante o período de exposição repetida (D3 ao D6) fundamentada no consumo diário das larvas de *A. mellifera* Africanizada.

Exposição repetida	Grupos piraclostrobina		
	PT1 (ng/larva)	PT2 (ng/larva)	PT3 (ng/larva)
D3 (20 µL)	18,23	1,88	0,61
D4 (30 µL)	27,34	2,82	0,91
D5 (40 µL)	36,45	3,76	1,21
D6 (50 µL)	45,56	4,70	1,51
<b>Intake total</b>	127,58	13,16	4,24

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Posteriormente ao período da exposição repetida, no D7, a umidade no interior da caixa hermética e da estufa incubadora foi alterada e regulada para 80%. Esse período é o começo da pupação das larvas. No D15, as cúpulas com as pupas (n = 20) foram movidas

paras as *beecages* (potes plásticos, 250 mL, 9 cm x 7 cm) com alimentadores contendo xarope (50% sacarose + 50% água, v:v) organizadas conforme o grupo experimental/colônia e mantidas na estufa incubadora com umidade relativa a  $70\% \pm 10\%$ .

## 2.6. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO REPETIDA

Durante o período da exposição repetida (D3 ao D6), a mortalidade larval dos grupos experimentais foi contabilizada. A partir do D7 ao D14, a taxa de pupação e a taxa de emergência acumulada do período do D15-D22 foram quantificadas. Como forma de verificar os efeitos da exposição larval nas abelhas adultas, a taxa de sobrevivência das abelhas emergentes foi avaliada até a morte do último indivíduo.

## 2.7. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS INTESTINOS DE LARVAS E ADULTOS

Foram coletadas cinco larvas de quinto instar pré-defecantes e cinco adultas recém-emergidas (com até 48 horas) de cada grupo experimental, anestesiadas a 4 °C por um minuto e dissecadas em temperatura ambiente utilizando um estereomicroscópio (Leica EZ4 HD) para remoção dos intestinos. Os órgãos foram fixados individualmente em solução fixadora por 24 horas seguindo a metodologia utilizada por Domingues *et al.* (2020a) e Domingues *et al.* (2020b) e desidratados em concentrações crescentes de etanol a 4 °C conforme descrito por Silva-Zacarin *et al.* (2012). Posteriormente a essa etapa, os órgãos foram imersos em uma solução de álcool - xilol (1:1) por uma hora e na sequência, imersos em xilol puro pelo período de três horas. Na continuação do processamento, os órgãos foram embebidos em parafina líquida ( $60\text{ °C} \pm 2$ ), sendo realizado três trocas de uma hora cada, e incluídos em parafina ultrapura (Paraplast) em temperatura ambiente. Os intestinos emblocados foram submetidos ao micrótomo para obtenção de secções histológicas sequenciais de 8 µm. Foram confeccionadas oito lâminas para cada um dos cinco indivíduos de larvas e adultos, contendo em média 12 cortes por lâmina.

## 2.8. PROCESSAMENTO DAS LÂMINAS PARA IMUNO-FLUORESCÊNCIA

Inicialmente, as lâminas silanizadas (StarFrost®) contendo as secções histológicas dos intestinos de larvas e adultos foram desparafinizadas por imersão ao xilol puro, três banhos de cinco minutos, seguido da solução de álcool - xilol (1:1) por cinco minutos e álcool absoluto

(100%) por 10 minutos. Após a desparafinização realizada, os intestinos das lâminas foram reidratados por meio de concentrações decrescentes de etanol (95%, 80%, 70%, 60% e 50%) pelo período de cinco minutos em cada concentração, conforme descrito por Silva-Zacarin *et al.* (2012). Com a reidratação concluída, as lâminas foram imersas em tampão citrato 0,1M (pH 6,0) com triton 0,05% e irradiadas no micro-ondas (700-750W) por 120 segundos para permeabilização-recuperação antigênica. Por fim, as lâminas foram lavadas cinco vezes, de um minuto cada, com tampão fosfato-salino (PBS - pH 7,4).

### **2.8.1. Detecção de morte celular pelo método do TUNEL**

Lâminas contendo as secções histológicas dos intestinos de três indivíduos por grupo experimental, foram utilizadas para a técnica de detecção de morte celular pelo método TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase - mediated dUTP nick end labeling*), por meio do “*In Situ Cell Death Kit, Fluorescein*” (Roche, Sigma-Aldrich - REF 11684795910) seguindo as instruções do manual do fabricante. Após a reação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS (pH 7,4) em temperatura ambiente e montadas com o *Fluoromount-G, with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ref 00-4959-52). Um controle positivo incubado com DNase-I (3000 U/mL a 3U/mL em tampão Tris-HCl, pH 7,5 - 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/mL albumina sérica bovina) por 10 minutos a temperatura ambiente, para indução de quebras no DNA e um controle negativo sem a solução de TUNEL, foram adicionados. As análises foram conduzidas em um microscópio confocal de varredura a laser (LEICA TCS-SP8) conforme configurações descritas em Domingues *et al.* (2017), sendo 36 secções histológicas de cada grupo experimental analisadas qualitativamente para presença de marcações de fragmentação no DNA dos intestinos de larvas e adultos de *A. mellifera* Africanizada.

### **2.8.2. Marcação da matriz peritrófica (WGA-FITC)**

Lâminas contendo as secções histológicas dos intestinos de três indivíduos por grupo experimental, foram utilizadas para determinar a estabilidade da matriz peritrófica detectando a quitina utilizando a lectina de *Triticum vulgare* (trigo) conjugada com FITC (Sigma-Aldrich, L4895) - WGA/FITC (*Wheat Germ Agglutinin/Fluorescein isothiocyanate*), conforme descrito por Oliveira *et al.* (2019). O WGA-FITC liga-se aos resíduos de N-acetilglucosamina (NAG) da quitina e a análise da intensidade do sinal de fluorescência indica a



quantidade de quitina na matriz peritrófica (MALTA *et al.*, 2016). Para realizar a quantificação nos intestinos de larvas e adultos, as lâminas foram incubadas individualmente com 100 µL da solução de trabalho do WGA-FITC (1:100) e cobertas com lamínulas de plástico pelo período de três horas a 28 °C. Após a incubação, as lâminas foram lavadas com PBS (3x), montadas com o *Fluoromount-G, with DAPI* e fotodocumentadas em microscópio confocal de varredura a laser (LEICA TCS-SP8), utilizando a objetiva de 20 x, seguindo as seguintes configurações: Intensidade do laser em 3%, *Smart Gain* 1100.0 V (*brightness*), *Smart Offset* -30% (*background*), *Pinhole* 0.50 AU e *Zoom* 2.0 (larvas) e 3.0 (adultos).

Trinta imagens de cada grupo experimental (n= 3 indivíduos, 10 imagens por indivíduo) foram analisadas, onde em cada imagem foram selecionadas 10 regiões de interesse com 15 µm de largura e 15 µm de altura, de forma a abranger toda a extensão do órgão nas imagens, totalizando 300 análises por grupo. A quantificação da intensidade de marcação do WGA conjugado com FITC foi realizada utilizando o software *ImageJ*, por meio da análise de histograma de intensidade (unidade = pixels) para o verde.

## 2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do *software* R (versão 3.6.1; R *Foundation for Statistical Computing, Vienna, AT*, 2019). Os dados referentes aos efeitos biológicos da exposição repetida ao piraclostrobina foram analisados por meio de modelos lineares generalizados com distribuição quasibinomial e quasipoisson, seguido de pós-teste com valor de P ajustado por *Tukey* (LENTH, 2019). A adequabilidade do modelo foi avaliada pela análise de resíduos por meio de *half-normal plots* (DEMÉTRIO; HINDE; MORAL, 2014) do pacote “hnp” (MORAL; HINDE; DEMÉTRIO, 2017). A análise de sobrevivência foi realizada por meio do modelo de regressão de Cox e do pacote “*survival*” (THERNEAU; GRAMBSCH, 2000; THERNEAU, 2015). Utilizou-se o pacote “*ecotox*” para análise do tempo letal médio (HLINA *et al.*, 2018).

A análise da intensidade do sinal de fluorescência foi realizada pelo teste estatístico não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo pós-teste de múltiplas comparações de *Dunn's* por meio do *software* *GraphPad Prism* 9.0.0. (121) (*GraphPad Prism Software, Inc.*). Os resultados foram apresentados com média ± erro padrão e o nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1. EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO REPETIDA AO PIRACLOSTROBINA

A exposição repetida durante a fase larval ao fungicida piraclostrobina não afetou o desenvolvimento pós-embrionário (mortalidade, pupação e emergência) quando comparado com os grupos controles ( $P > 0,05$ ), conforme evidenciado na tabela (4). Embora sem diferença estatística, foi possível observar menor taxa de emergência no grupo PT1. A mortalidade larval causada pelo dimetoato (DMT), inseticida de referência utilizado no presente trabalho, apresentou média de  $84,72\% \pm 4,62\%$  dos indivíduos expostos, validando o bioensaio ( $P < 0,0001$ ) de acordo com o protocolo da OECD nº 239 (2016).

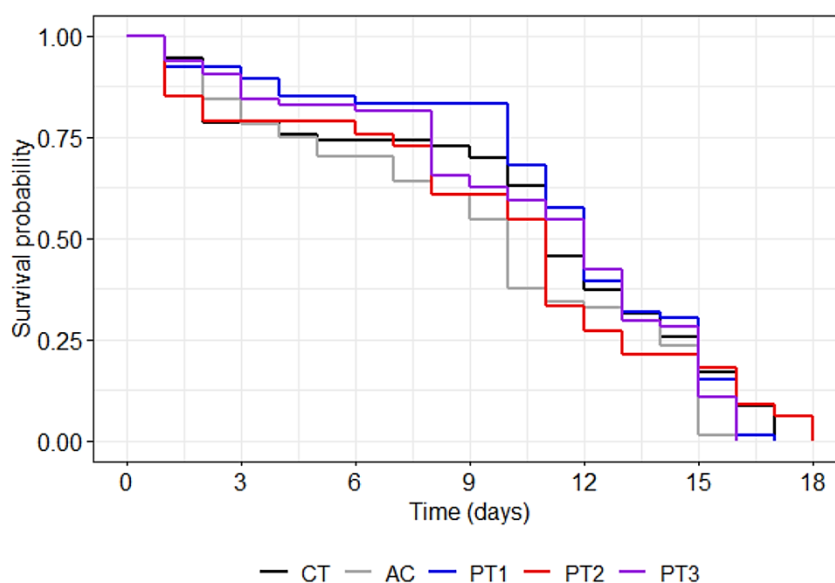
**TABELA 4** - Taxa média relativa (média  $\pm$  erro padrão) da mortalidade larval, taxa de pupação e taxa de emergência de operárias de *A. mellifera* Africanizada expostas de forma repetida ao fungicida piraclostrobina durante a fase larval. <sup>1</sup>Não há diferença significativa entre os grupos experimentais ( $P > 0,05$ ).

Grupos	Mortalidade larval <sup>1</sup>	Taxa de pupação <sup>1</sup>	Taxa de emergência <sup>1</sup>
CT	10,15 $\pm$ 4,17	79,76 $\pm$ 5,10	77,28 $\pm$ 7,58
AC	7,89 $\pm$ 3,17	80,73 $\pm$ 4,13	84,04 $\pm$ 7,21
PT1	7,91 $\pm$ 2,32	77,47 $\pm$ 3,84	66,20 $\pm$ 10,58
PT2	15,64 $\pm$ 3,64	65,60 $\pm$ 6,73	81,84 $\pm$ 4,91
PT3	7,63 $\pm$ 3,09	72,37 $\pm$ 4,99	72,11 $\pm$ 10,39
DMT	84,72 $\pm$ 4,62	-	-

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A sobrevivência das abelhas recém-emergidas dos grupos PT1, PT2 e PT3 não evidenciaram diferença significativa ( $P = 0,1281$ ) em relação aos grupos controle (Figura 4), assim como também observado no tempo letal médio (TL50) (Tabela 5).

**FIGURA 4** - Curva de sobrevivência de operárias recém-emergidas de *A. mellifera* Africanizada expostas de forma repetida ao fungicida piraclostrobina na fase larval. n = 65 abelhas por grupo experimental.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**TABELA 5** - Efeito do fungicida piraclostrobina no tempo letal médio, em dias, de operárias adultas de *A. mellifera* Africanizada. **TL50:** tempo letal médio, **CL:** limites de confiança com 95% de probabilidade,  $\chi^2$ : qui-quadrado, **P:** probabilidade. <sup>a</sup>Não há diferença significativa entre os grupos experimentais ( $P < 0,05$ ).

Grupos	TL50 (CL)		$\chi^2$	P
CT	8,61 (7,75 - 9,45)	a	27,7	0,010
AC	9,92 (8,72 - 11,05)	a	42,0	< 0,001
PT1	10,53 (9,33 - 11,61)	a	33,0	< 0,001
PT2	8,96 (8,07 - 9,76)	a	11,7	0,387
PT3	10,19 (9,37 - 11,04)	a	24,1	< 0,001

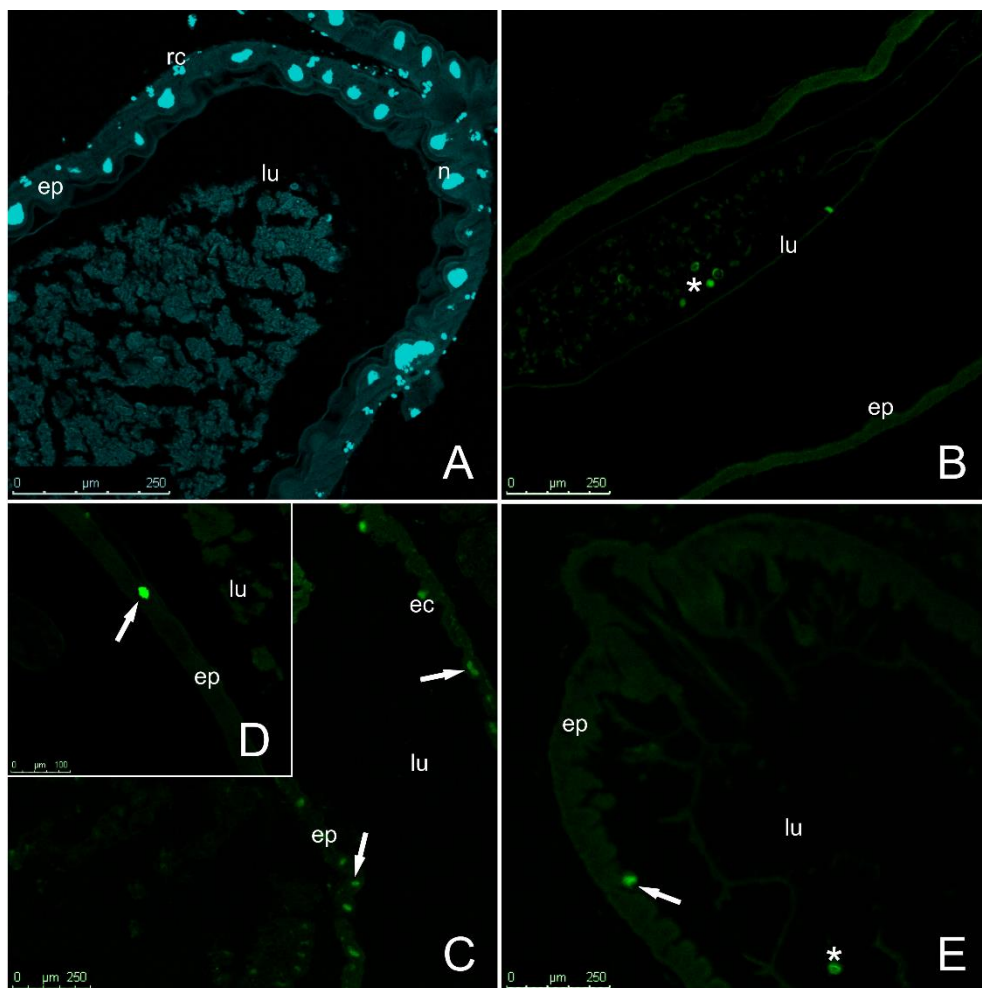
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.2. REAÇÃO DO TUNEL

O diagnóstico de morte celular, por fragmentação do DNA, realizado pelo método do TUNEL no intestino das larvas e adultas de *A. mellifera* Africanizada pode ser observado nas figuras 5 e 6 respectivamente. Para as abelhas dos grupos CT, AC e PT3, não foram

evidenciadas imunomarcações positivas no epitélio do intestino (Figura 5A-B). Em contrapartida, as abelhas dos grupos PT1 e PT2 (concentrações mais altas) demonstraram imunomarcações positivas no epitélio intestinal (Figura 5C-E). É importante destacar que nas regiões de diferenciação celular ao redor dos ninhos de células regenerativas não houve imunomarcação positiva em nenhum dos grupos experimentais, assim como nos núcleos das células imaturas dos ninhos de células regenerativas, que também foram negativos para a reação do TUNEL. Marcações positivas de células já eliminadas e localizadas no lúmen do intestino, foram observadas em todos os grupos experimentais.

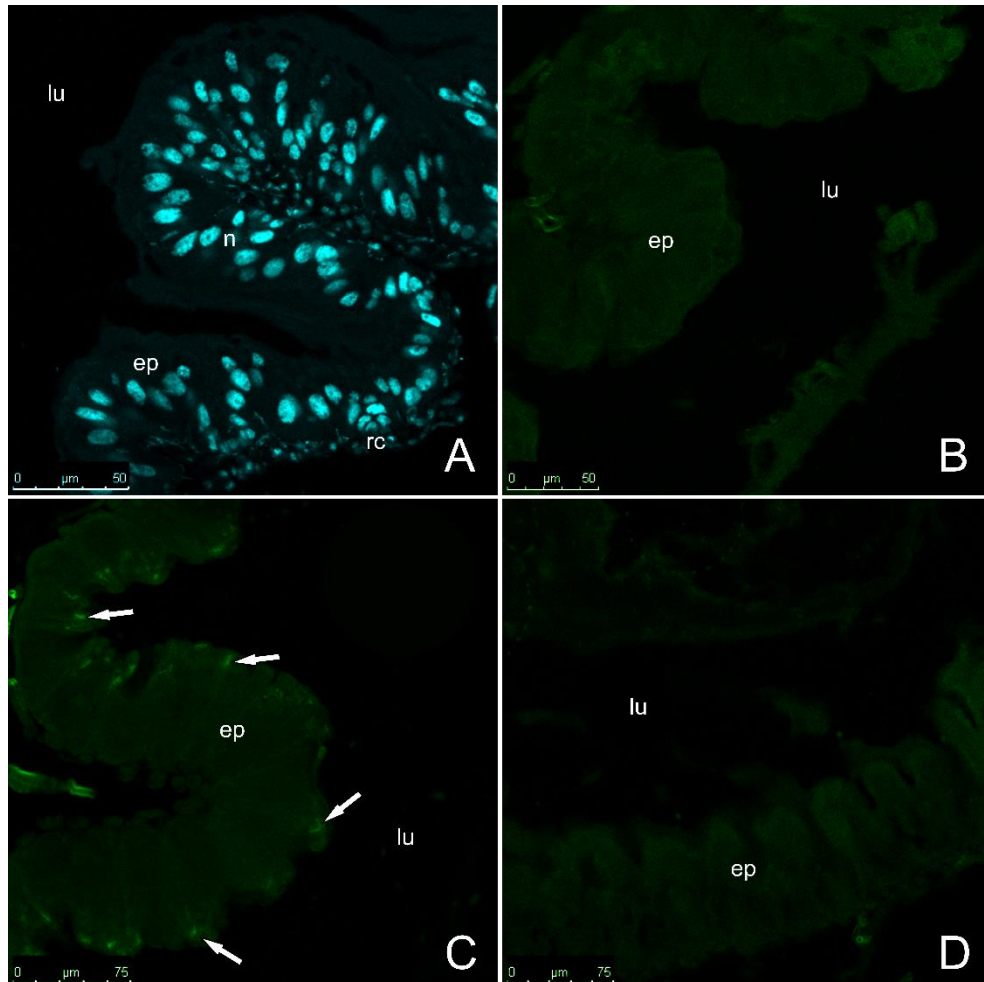
**FIGURA 5** - Detecção de morte celular pelo método do TUNEL em larvas de *A. mellifera* Africanizada. **A** - Epitélio do intestino de larvas do grupo CT marcado com DAPI. **B** - Controle negativo da reação do TUNEL no epitélio intestinal. **C** - Epitélio intestinal de larvas do grupo PT1 com imunomarcação positiva. **D** - Imunomarcação positiva com destaque em um núcleo de um indivíduo do grupo PT1. **E** - Epitélio intestinal de larvas do grupo PT2 com imunomarcação positiva. **Legenda:** asteriscos = células no lúmen com imunomarcação positiva, **ec** = célula sendo eliminada para o lúmen, **ep** = epitélio, **lu** = lúmen, **n** = núcleo, **rc** = ninhos de células regenerativas, **seta branca** = núcleos no epitélio intestinal positivos para marcação pelo método do TUNEL.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Em relação aos indivíduos adultos, as abelhas dos grupos CT, AC, PT2 e PT3 não apresentaram imunomarcações positivas para o diagnóstico de morte celular pelo método do TUNEL. Apenas as abelhas do grupo exposto à concentração mais alta do fungicida, PT1, apresentaram marcação positiva, embora menos pronunciada que na fase larval (Figura 6C). Assim como nas larvas, não foram observadas imunomarcações positivas na região dos ninhos de células regenerativas (Figura 6) e foram observadas imunomarcações positivas de células eliminadas para o lúmen em todos os grupos experimentais.

**FIGURA 6** - Detecção de morte celular pelo método do TUNEL em adultos de *A. mellifera* Africanizada. **A** - Epitélio do intestino de abelhas adultas do grupo CT marcado com DAPI. **B** - Controle negativo da reação do TUNEL. **C** - Epitélio intestinal de abelhas adultas do grupo PT1 com imunomarcação positiva. **D** - Epitélio intestinal de larvas do grupo PT2 negativo para reação do TUNEL. **Legenda:** **ep** = epitélio, **lu** = lúmen, **n** = núcleo, **rc** = ninhos de células regenerativas, **seta branca** = núcleos no epitélio intestinal positivos para marcação pelo método do TUNEL.

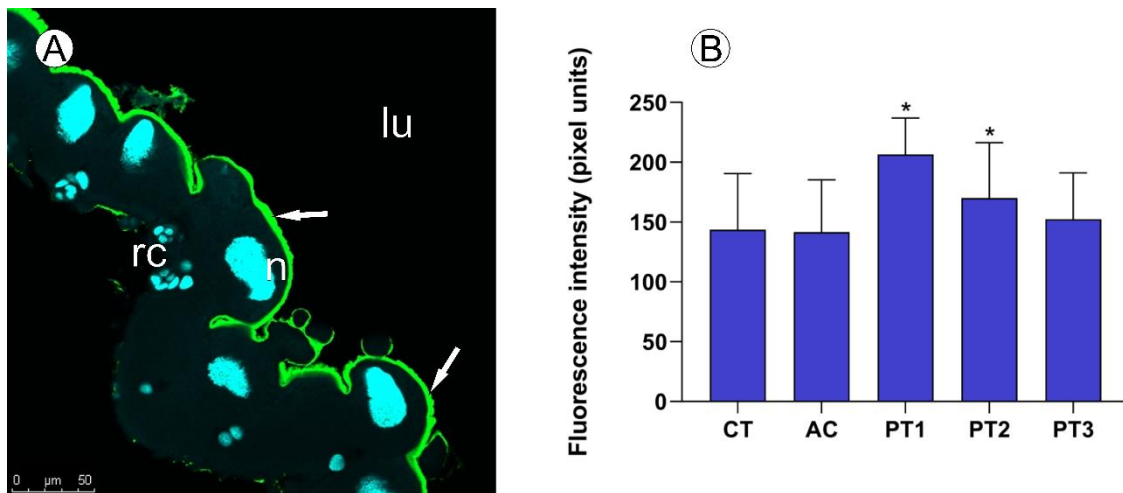


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.3. QUANTIFICAÇÃO DO WGA-FITC

A marcação de quitina da matriz peritrófica (ectoperitrófica) foi visualizada por todo o intestino de larvas e adultos de *A. mellifera* Africanizada. A quantificação da marcação de quitina pelo WGA-FITC (Figura 7A) revelou um aumento da intensidade nos intestinos das larvas de abelhas do grupo PT1 (média = 206,49) com diferença estatística ( $P < 0,0001$ ) em relação aos demais grupos, CT (média = 143,63), AC (média = 141,52), PT2 (média = 170,19) e PT3 (média = 152,40) (Figura 7B). Os intestinos das larvas do grupo PT2, foram diferentes estatisticamente ( $P < 0,001$ ) dos grupos controles e do grupo PT3 ( $P < 0,005$ ) (Figura 7B). As larvas dos grupos CT, AC e PT3 são estatisticamente semelhantes entre si ( $P > 0,05$ ).

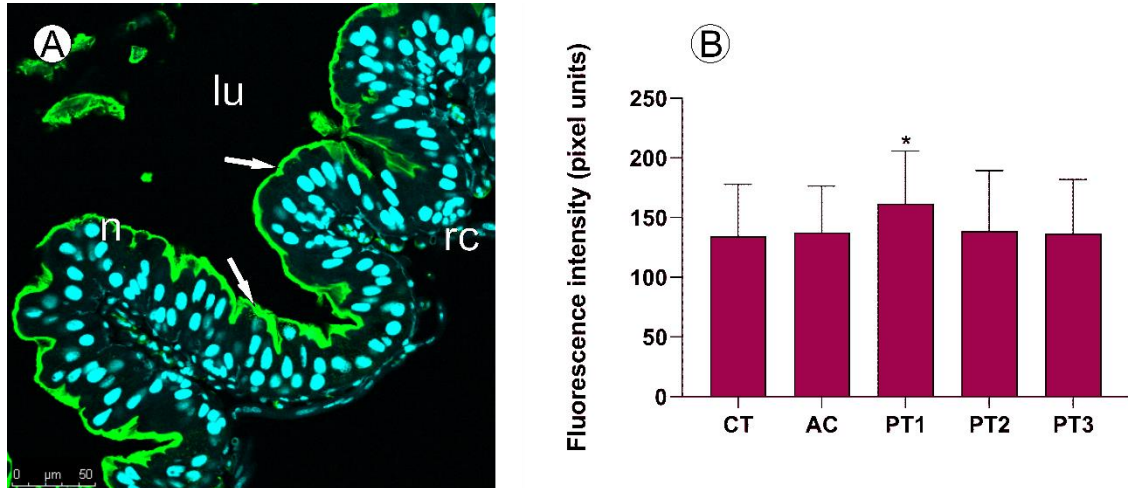
**FIGURA 7** - Intensidade de fluorescência de quitina na matriz peritrófica (ectoperitrófica) do intestino de larvas de *A. mellifera* Africanizada expostas a diferentes concentrações do fungicida piraclostrobina na fase larval. **A** - Intestino marcado com WGA-FITC e os núcleos com DAPI. **B** - Intensidade de marcação da fluorescência em unidades de pixel. **Legenda:** lu = lúmen, n = núcleo marcado com DAPI, rc = ninho de células regenerativas, seta branca = marcação com WGA-FITC. \*Diferença estatística ( $P < 0,05$ ).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação as operárias recém-emergidas (Figura 8A-B), as abelhas do grupo PT1 (média = 161,78) apresentaram diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) para todos os demais grupos CT (média = 134,41), AC (média = 137,70), PT2 (média = 138,56) e PT3 (média = 136,73) (Figura 8B). Os demais grupos experimentais, CT, AC, PT2 e PT3 são estatisticamente semelhantes entre si ( $P > 0,05$ ) (Figura 8B).

**FIGURA 8** - Intensidade de fluorescência de quitina na matriz peritrófica (ectoperitrófica) do intestino de operárias recém-emergidas de *A. mellifera* Africanizada expostas a diferentes concentrações do fungicida piraclostrobina na fase larval. **A** - Intestino marcado com WGA-FITC e os núcleos com DAPI. **B** - Intensidade de marcação da fluorescência em unidades de pixel. **Legenda:** **lu** = lúmen, **n** = núcleo marcado com DAPI, **rc** = ninho de células regenerativas, **seta branca** = marcação com WGA-FITC. \*Diferença estatística ( $P < 0,05$ ).



Fonte: Elaborado pelo autor.

## 4 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui, reforçam a importância da análise dos efeitos tardios do fungicida piraclostrobina após exposição na fase larval, uma vez que embora não tenhamos observado efeitos biológicos imediatos, respostas tardias foram evidenciadas por meio da reação do TUNEL e pela quantificação da matriz peritrófica (ectoperitrófica) utilizando a técnica do WGA-FITC. Segundo a revisão realizada por Chmiel *et al.* (2020), os autores destacam a notável ausência de trabalhos com efeitos subletais utilizando fungicidas quando comparado com outros agrotóxicos, como os inseticidas. Sendo assim, o presente estudo é relevante para reduzir as lacunas de conhecimento em relação aos fungicidas, principalmente analisando o desenvolvimento pós-embrionário.

A ausência de efeitos das concentrações do fungicida piraclostrobina na mortalidade larval, taxa de pupação e taxa de emergência, podem estar relacionadas com os sistemas de desintoxicação presentes em *A. mellifera* (BERENBAUM; JOHNSON, 2015), gerando maior gasto energético como uma resposta compensatória ao fungicida e consequentemente mantendo o desenvolvimento até a emergência dos adultos. Nesse sentido, sabendo que ao longo do processo de metamorfose, durante a pupação, as abelhas utilizam a reserva energética acumulada na fase larval para complementar o seu desenvolvimento (BISHOP, 1961; CRUZ-LANDIM, 2009), o desvio na demanda energética para responder ao piraclostrobina pode comprometer as mudanças induzidas durante a metamorfose e reduzir a performance das abelhas que irão emergir, onde em um cenário de exposição prolongada poderia comprometer a dinâmica populacional das colônias (DOMINGUES *et al.*, 2020a). Mussen, Lopez e Peng (2004) sugerem que, mesmo em concentrações residuais, os fungicidas podem interferir no desenvolvimento pós-embrionário de *A. mellifera*. Alguns estudos destacam a citotoxicidade de concentrações realísticas dos fungicidas no sistema hepatonefrocítico (DOMINGUES *et al.*, 2017), no intestino médio (CARNEIRO *et al.*, 2020; TADEI *et al.*, 2020) e túbulos de Malpighi (BATISTA *et al.*, 2020) de operárias recém-emergidas.

Corroborando com os nossos achados, estudos utilizando o piraclostrobina (princípio ativo) (TADEI *et al.*, 2019) e uma formulação comercial (Comet<sup>®</sup>) (TADEI *et al.*, 2020) também não observaram efeitos sob os mesmos parâmetros analisados no presente trabalho. A exemplo dos fungicidas, estudos utilizando concentração de campo do inseticida neonicotinóide tiametoxam (0,001 ng/ $\mu$ L) demonstraram ausência de efeitos na taxa de mortalidade larval, taxa de pupação e taxa de emergência de abelhas adultas (FRIOL *et al.*,



2017). Entretanto, em todos os estudos destacados os autores observaram importantes efeitos tardios no desenvolvimento em outros biomarcadores como os comportamentais, histopatológicos, imuno-histoquímicos e ultraestruturais.

Em relação a sobrevivência e o tempo letal médio das abelhas recém-emergidas, os nossos resultados estão de acordo com os achados de Tadei *et al.* (2020), onde os autores evidenciaram que a exposição oral repetida ao piraclostrobina (4,93 ng/mL) na fase larval não afetou a sobrevivência das operárias adultas de *A. mellifera* Africanizada. Domingues *et al.* (2020a), em estudo comparativo com indivíduos adultos (recém-emergidas e forrageiras), verificaram que a exposição oral a três concentrações do piraclostrobina (0,125 ng/mL, 0,025 ng/mL, 0,005 ng/mL) alterou o padrão de sobrevivência apenas das forrageiras e não demonstrou efeito na longevidade das abelhas recém-emergidas. No mesmo sentido, Carneiro *et al.* (2020) também não verificaram efeitos imediatos após exposição ao fungicida iprodione (LD50 = 2 mg/kg).

Contudo, foi possível notar respostas a nível celular no epitélio intestinal de abelhas dos grupos PT1 (larvas e adultos) e PT2 (larvas). O diagnóstico do TUNEL foi positivo para as células digestivas, que exercem importantes funções como: digestão e absorção de nutrientes, capacidade excretora e síntese dos componentes da matriz peritrófica (SERRÃO; CRUZ-LANDIM, 1996; SILVA-ZACARIN *et al.*, 2011; TERRA; FERREIRA, 2012). Desta forma, lesões nestas células podem reduzir a viabilidade do órgão. Os nossos achados corroboram com Tadei *et al.* (2020), que detectaram marcações positivas para a formulação comercial e o ingrediente ativo de piraclostrobina. Batista *et al.* (2020) para o picoxistrobina e Carneiro *et al.* (2020) para o iprodione também destacaram alterações nas células digestivas de operárias de *A. mellifera* Africanizada.

As marcações positivas para fragmentação do DNA em abelhas recém-emergidas do grupo PT1, sugerem que não houve completa metabolização e eliminação do piraclostrobina ao longo da metamorfose. Por sua característica pouco polar ou lipofílica, é possível que o fungicida tenha sido armazenado no tecido predominante das larvas e pré-pupas, o corpo gorduroso. Segundo Bishop (1961), este tecido pode representar 60% do peso corporal das larvas e está diretamente em contato com a hemolinfa, ou seja, o piraclostrobina pode chegar rapidamente até o tecido e permanecer devido as características de afinidade de sua molécula. Silva *et al.* (2015) identificaram a presença de anomalias em larvas e pupas após exposição aguda, no quarto dia do desenvolvimento larval, ao fipronil e os autores sugerem que o

inseticida provocou alterações no metabolismo das células do corpo gorduroso comprometendo o desenvolvimento padrão de *A. mellifera* Africanizada.

Embora as células digestivas tenham evidenciado marcação de fragmentação do DNA, o ninho de células regenerativas de larvas e adultos não foi afetado e conseqüentemente a integridade do epitélio intestinal foi mantida, o que corrobora com a ausência de efeitos na mortalidade e sobrevivência descritos aqui. As células que compõe o ninho são importantes para manter o nível de homeostase de digestão e absorção de nutrientes do indivíduo, uma vez que são as responsáveis pela renovação do epitélio, que diminui progressivamente com a idade (MARTINS *et al.*, 2016). Domingues *et al.* (2020a) destacam a maior sensibilidade do epitélio intestinal de forrageiras para o piraclostrobina.

A maior intensidade de marcação da quitina da matriz peritrófica identificada para as larvas (PT1 e PT2) e adultas (PT1) sugere uma alteração (aumento) na quantidade de síntese dos componentes da matriz peritrófica (ectoperitrófica) provocada pelo fungicida. De acordo com Shao, Devenport e Jacobs-Lorena (2001), o balanço entre a síntese e degradação da matriz peritrófica dos insetos, que ocorre por meio da ação das quitinases e quitina-sintase, determina a sua espessura e as peritrofinas estão envolvidas na sua elasticidade e permeabilidade. Segundo Oliveira *et al.* (2019), não há diferenças na permeabilidade ao longo do intestino médio. Nesse sentido, a maior síntese de componentes da matriz peritrófica, evidenciado pela intensa marcação, estaria barrando grande quantidade absorção do fungicida e com isso mitigando os efeitos adversos. Em *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) já foram descritos, por meio de evidências genéticas, efeitos protetores da matriz peritrófica contra patógenos e toxinas (KURAISHI *et al.*, 2011).

Oliveira *et al.* (2019), utilizando a marcação da matriz peritrófica com WGA, demonstraram que a concentração de quitina na matriz do intestino médio de *A. mellifera* foi significativamente maior na região anterior do que na posterior e, adicionalmente, maior nas forrageiras do que nas nutridoras. Com base no exposto, podemos inferir que as larvas tiveram uma resposta protetora ao fungicida, embora os estudos sobre a matriz peritrófica em larvas de abelhas sejam limitados. Os estudos sobre a matriz peritrófica das larvas de insetos concentram-se em espécies consideradas pragas agrícolas e visam compreender a estrutura e funcionamento da matriz peritrófica para a síntese de novos bioinseticidas e novas tecnologias de controle de pragas (HEGEDUS *et al.*, 2009; SANDOVAL-MOJICA; SCHARF, 2016; WANG *et al.*, 2016). Nessa perspectiva, o estudo fornece informações relevantes sobre como

efeitos tardios devem ser considerados e como a exposição pode alterar o padrão de desenvolvimento pós-embrionário das abelhas *A. mellifera*.

## 5 CONCLUSÕES

Nossos resultados evidenciaram que, após exposição ao fungicida piraclostrobina na fase larval, o epitélio do intestino de larvas e adultos apresentaram indicação de morte celular por fragmentações no DNA das células digestivas e aumento na intensidade de marcação da matriz peritrófica. Estes achados demonstram que embora o piraclostrobina não tenha causado mortalidade, a resposta energética das larvas pode gerar abelhas emergentes menos saudáveis e com isso reduzir a força da colônia, já que essas abelhas irão cuidar das atividades internamente e posteriormente serão responsáveis pela identificação e coleta de recursos. Nesse sentido, destacamos a importância de estudos que levem em consideração os efeitos tardios da exposição aos fungicidas durante a fase larval, uma vez que essa lacuna de conhecimento ainda é alta quando comparada com os inseticidas.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, F. C.; DOMINGUES, C. E. C. Hepato-Nephrotoxic System: a novel model of biomarkers for analysis of the ecology of stress in environmental biomonitoring. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. 1-9, 2015.
- AUPINEL, P.; FORTINI, D.; DUFOUR, H.; TASEI, J. N.; MICHAUD, B.; ODOUX, J. F.; PHAM-DELEÈGUE, M. H. Improvement of artificial feeding in a standard *in vitro* method for rearing *Apis mellifera* larvae. **Bulletin of Insectology**, v. 58, n. 2, p. 107-111, 2005.
- BABENDREIER, D.; KALBERER, N.; ROMEIS, J.; FLURI, P.; BIGLER, F. Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. **Apidologie**, v. 35, n. 3, p. 293-300, 2004.
- BATISTA, A. C.; DOMINGUES, C. E. C.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 1-10, 2020.
- BERENBAUM, M. R.; JOHNSON, R. M. Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. **Current Opinion in Insect Science**, v. 10, p. 51-58, 2015.
- BISHOP, G. H. Growth rates of honey bee larva. **Journal of Experimental Zoology**, v. 146, n. 1, p. 11-20, 1961.
- BLACQUIÈRE, T.; SMAGGHE, G.; van GESTEL, C. A. M.; MOMMAERST, V. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 973-992, 2012.
- CALDERONE, N. W. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 1-27, 2012.
- CARNEIRO, L. S.; MARTÍNEZ, 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. 1-7, 2020.
- CATAE, A. F.; ROAT, T. C.; OLIVEIRA, R. A.; NOCELLI, R. C.; MALASPINA, O. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae). **Microscopy Research and Technique**, v. 77, p. 274-281, 2014.
- CHAPMAN, R. F. **The insect: structure and function**. 5. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. 959 p.
- CHMIEL, J. A.; DAISLEY, B. D.; PITEK, A. P.; THOMPSON, G. J.; REID, G. Understanding the effects of sublethal pesticide exposure on honey bees: a role for probiotics as mediators of environmental stress. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 1-19, 2020.

CIZELJ, I.; GLAVAN, G.; BOZIC, J.; OVEN, I.; MRAK, V.; NARAT, M. Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). **Pesticide Biochemistry Physiology**, v. 128, p. 68-75, 2016.

CRUZ, A. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O. Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. **Cell Biology and Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 165-176, 2010.

CRUZ-LANDIM, C.; RODRIGUES, L. Comparative anatomy and histology of the alimentary canal of adult Apinae. **Journal of Apicultural Research**, v. 6, n. 1, p. 17-18, 1967.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e funções de sistemas**. 1. ed. São Paulo: UNESP, 2009. 416 p.

CRUZ-LANDIM, C. Histological and cytological studies on the fat body of the queen honeybee abdomen during the active oviposition phase. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 45, n. 3, p. 221-232, 1985.

CULLEN, M. G.; THOMPSON, L. J.; CAROLAN, J. C.; STOUT, J. C.; STANLEY, D. A. Fungicides, herbicides and bees: a systematic review of existing research and methods. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. 1-17, 2019.

DAI, P.; YAN, Z.; MA, S.; YANG, Y.; WANG, Q.; HOU, C.; WU, Y.; LIU, Y.; DIAO, Q. The herbicide glyphosate negatively affects midgut bacterial communities and survival of honey bee during larvae reared in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 29, p. 7786-7793, 2018.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; WATKINS, D. E.; CHAMBERS, M. L.; HIDALGO, G. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economy Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518-2528, 2015.

DEMÉTRIO, C. G. B.; HINDE, J.; MORAL, R. A. Models for Overdispersed Data in Entomology. In: FERREIRA, C. P.; GODOY, W. A. C. (Eds.). **Ecological Modelling Applied to Entomology**. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland, 2014. p. 219-259.

DOMINGUES, C. E. C.; ABDALLA, F. C.; BALSAMO, P. J.; PEREIRA, B. V. R.; HAUSEN, M. A.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

DOMINGUES, C. E. C.; INOUE, L. V. B.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees. **Environmental Pollution**, v. 266, n. 2, p. 1-12, 2020a.

DOMINGUES, C. E. C.; INOUE, L. V. B.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian

native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 1-19, 2020b.

FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELL, R. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 719-731, 2014.

FRIOL, P. S.; CATAE, A. F.; TAVARES, D. A.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56-66, 2017.

GARIBALDI, L. A.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ANDERSSON, G. K. S. Towards an integrated species and habitat management of crop pollination. **Current Opinion in Insect Science**, v. 21, p. 105-114, 2017.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1-16, 2015.

GREGORC, A.; BOWEN, I. D. Histochemical characterization of cell death in honeybee larvae midgut after treatment with *Paenibacillus larvae*, amitraz and oxytetracycline. **Cell Biology International**, v. 24, n. 5, p. 319-324, 2000.

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

HEGEDUS, D.; ERLANDSON, M.; GILLOTT, C.; TOPRAK, U. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p. 285-302, 2009.

HLINA, B.L.; BIRCEANU, O.; TESSIER, L. R.; ROBINSON, C.; MUHAMETSAFINA, A.; BRAGG, L. M.; SERVOS, M. R.; WILKIE, M. P. *In Preparation*. Changes in the sensitivity of piscicide in an invasive species. **Environmental Science & Technology**, 2018.

HUNG, K.-L. J.; KINGSTON, J. M.; ALBRECHT, M.; HOLWAY, D. A.; KOHN, J. R. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1870, p. 1-8, 2018.

KUBIK, M.; NOWACKI, J.; PIDEK, A.; WARAKOMSKA, Z.; MICHALCZUK, L.; GOSZCZYŃSKI, W. Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. **Apidologie**, v. 30, n. 6, p. 521-532, 1999.

KURAIISHI, T.; BINGGELI, O.; OPOTA, O.; BUCHON, N.; LEMAITRE, B. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 38, p. 15966-15971, 2011.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 525-550, 1997.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. Structure and ultrastructure of the insect midgut. *In*: LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.). **Biology of the Insect Midgut**. Netherlands: Springer, 1996. p. 3-33.

LENTH, R. Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R Packag. version 1.3.5.1, 2019.

LIAO, L.-H.; WU, W.-Y.; DAD, A.; BERENBAUM, M. R. Fungicide suppression of flight performance in the honeybee (*Apis mellifera*) and its amelioration by quercetin. **Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)**, v. 286, n. 197, p. 1-8, 2019.

LUNDIN, O.; RUNDLOF, M.; SMITH, H. G.; FRIES, I.; BOMMARCO, R. Neonicotinoid insecticides and their impacts on bees: a systematic review of research approaches and identification of knowledge gaps. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. 1-20, 2015.

MALTA, J.; MARTINS, G. F.; WENG, J.-L.; FERNANDES, K. M.; MUNFORD, M. L.; RAMALHO-ORTIGÃO, M. Effects of specific antisera targeting peritrophic matrix-associated proteins in the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. **Acta Tropica**, v. 159, p. 161-169, 2016.

MARTINS, G. F.; NEVES, C. A.; CAMPOS, L. A. O.; SERRÃO, J. E. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron**, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2006.

MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of US crops in 2000. **Bee Culture**, v. 128, p. 1-15, 2000.

MORAL, R. A.; HINDE, J.; DEMÉTRIO, C. G. B. Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package. **Journal of Statistical Software**, v. 81, n. 10, p. 1-23, 2017.

MUSSEN, E. C.; LOPEZ, J. E.; PENG, C. Y. S. Effects of selected fungicides on growth and development of larval honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Environmental Entomology**, v. 33, n. 5, p. 1151-1154, 2004.

NEUMANN, P.; CARRECK; N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2010.

OECD. Honey bee (*Apis mellifera*) larval toxicity test, repeated exposure, n° 239. **OECD Environment, Health and Safety Publications**, 2016.

OLIVEIRA, A. H.; FERNANDES, K. M.; GONÇALVES, W. G.; ZANUNCIO, J. C.; SERRÃO, J. E. A peritrophin mediates the peritrophic matrix permeability in the workers of the bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera*. **Arthropod Structure & Development**, v. 53, p. 1-9, 2019.

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, p. 1-9, 2013.



RADER, R.; HOWLETT, B. G.; CUNNINGHAM, S. A.; WESTCOTT, D. A.; NEWSTROM-LLOYD, L. E.; WALKER, M. K.; TEULON, D. A. J.; EDWARDS, W. Alternative pollinator taxa are equally efficient but not as effective as the honeybee in a mass flowering crop. **Journal of Applied Ecology**, v. 46, n. 5, p. 1080-1087, 2009.

RUCKER, R. R.; THURMAN, W. N.; BURGETT, M. Honey bee pollination markets and the internalization of reciprocal benefits. **American Journal of Agricultural Economics**, v. 94, n. 4, p. 956-977, 2012.

SANCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees—a risk assessment. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 1-16, 2014.

SANDOVAL-MOJICA, A. F.; SCHARF, M. E. Gut genes associated with the peritrophic matrix in *Reticulitermes flavipes* (Blattodea: Rhinotermitidae): identification and characterization. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 2, p. 127-142, 2016.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Cytobios**, v. 88, p. 161-171, 1996.

SHAO, L.; DEVENPORT, M.; JACOBS-LORENA, M. The peritrophic matrix of hematophagous insects. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, n. 2, p. 119-125, 2001.

SILVA, C. A. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; DOMINGUES, C. E. C.; ABDALLA, F. C.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Fipronil effect on the frequency of anomalous brood in honeybee reared in vitro. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 450, p. 140, 2015.

SILVA-ZACARIN, E. C. M., COSTA-FERREIRA, R. A., NOCELLI, R. C. F., ROAT, T. C., PALMA, M. S., MALASPINA, O. Structure and function of the intestine and Malpighian tubules - from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. In: STEWART, E. M. (Org.). **Social Insects - Structure, Function, and Behavior**. New York: Nova Publishers, 2011. p. 121-142.

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. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2012. p. 696-703.

SIMON-DELISO, N.; SAN MARTIN, G.; BRUNEAU, E.; MINSART, L.-A.; MOURET, C.; HAUTIER, L. Honeybee colony disorder in crop areas: the role of pesticides and viruses. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. 1-16, 2014.

SIMON-DELISO, N.; SAN MARTIN, G.; BRUNEAU, E.; HAUTIER, L.; MEDRZYCKI, P. Toxicity assessment on honey bee larvae of a repeated exposition of a systemic fungicide, boscalid. **Bulletin of Insectology**, v. 70, n. 1, p. 83-89, 2017

SIMPSON, J. The significance of the presence of pollen in the food of worker larvae of the honeybee. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 96, n. 1, p. 117-120, 1955.

TADEI, R.; DOMINGUES, C. E. C.; MALAQUIAS, J. B.; CAMILO, E. V.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

TADEI, R.; MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis mellifera* and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 1-11, 2020.

TAVARES, D. A.; DUSSAUBAT, C.; KRETZSCHMAR, A.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O.; BÉRAIL, G.; BRUNET, J.-L.; BELZUNCES, L. P. Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages. **Environmental Pollution**, v. 229, p. 386-393, 2017.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370-378, 2015.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Exposure to thiamethoxam during the larval phase affects synapsin levels in the brain of the honey bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 523-528, 2019.

TELLAM, R. L.; WIJFFELS, G.; WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 87-101, 1999.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry and molecular biology of digestion. *In*: GILBERTE, L. I. (Ed.). **Insect molecular biology and biochemistry**. London: Academic Press, 2012. p. 365-418.

THERNEAU, T. M. A Package for Survival Analysis in S. 2015. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=survival>>. Acesso em: 10 Out. 2020.

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

TONG, Z.; DUAN, J.; WU, Y.; LIU, Q.; HE, Q.; SHI, Y.; YU, L.; CAO, H. A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in China. **Science of The Total Environment**, v. 640-641, p. 1578-1586, 2018.

WANG, Y.; XIU, J. F.; CHENG, J. Z.; LUO, M.; ZHAO, P.; SHANG, X. L.; WANG, T.; WU, J. W. Proteomic analysis of the peritrophic matrix from the midgut of third instar larvae, *Musca domestica*. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 29, n. 1, p. 56-65, 2016.

WU, J. Y.; ANELLI, C. M.; SHEPPARD, W. S. Sub-lethal effects of pesticide residues in

brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. **PLoS One**, v. 6, n. 2, p. 1-11, 2011.

YODER, J. A.; JAJACK, A. J.; ROSSELOT, A. E.; SMITH, T. J.; YERKE, M. C.; SAMMATARO, D. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. **Journal of Toxicology Environmental Health: Part A**, v. 76, n. 10, p. 587-600, 2013.

ZHU, W.; SCHMEHL, D. R.; MULLIN, C. A.; FRAZIER, J. L. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2014.

ZIOGA, E.; KELLY, R.; WHITE, B.; STOUT, J. C. Plant protection product residues in plant pollen and nectar: A review of current knowledge. **Environmental Research**, v. 189, p. 1-16, 2020.

## 4 CAPÍTULO 2

A pesquisa referente a este capítulo foi conduzida no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (câmpus de Rio Claro). O manuscrito referente a este capítulo foi publicado (novembro 2020) na revista científica *Environmental Pollution* (Fator de Impacto - 2019 = **6,792**) e está organizado conforme as normas da revista.

## **Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees☆**

Caio Eduardo da Costa Domingues<sup>a\*</sup>; Lais Vieira Bello Inoue<sup>a</sup>; Elaine Cristina Mathias da Silva-Zacarin<sup>b\*</sup>; Osmar Malaspina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP) - “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências (IB), Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Rio Claro, SP, Brazil

<sup>b</sup>Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Biologia (DBio), Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental (LEIA), Sorocaba, SP, Brazil

### **\*Corresponding author:**

Caio Eduardo da Costa Domingues, UNESP - CEIS, Avenida 24 A, nº 1515, Jardim Bela Vista, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brazil. Email: [cecdomingues@gmail.com](mailto:cecdomingues@gmail.com) (C.E.C. Domingues).

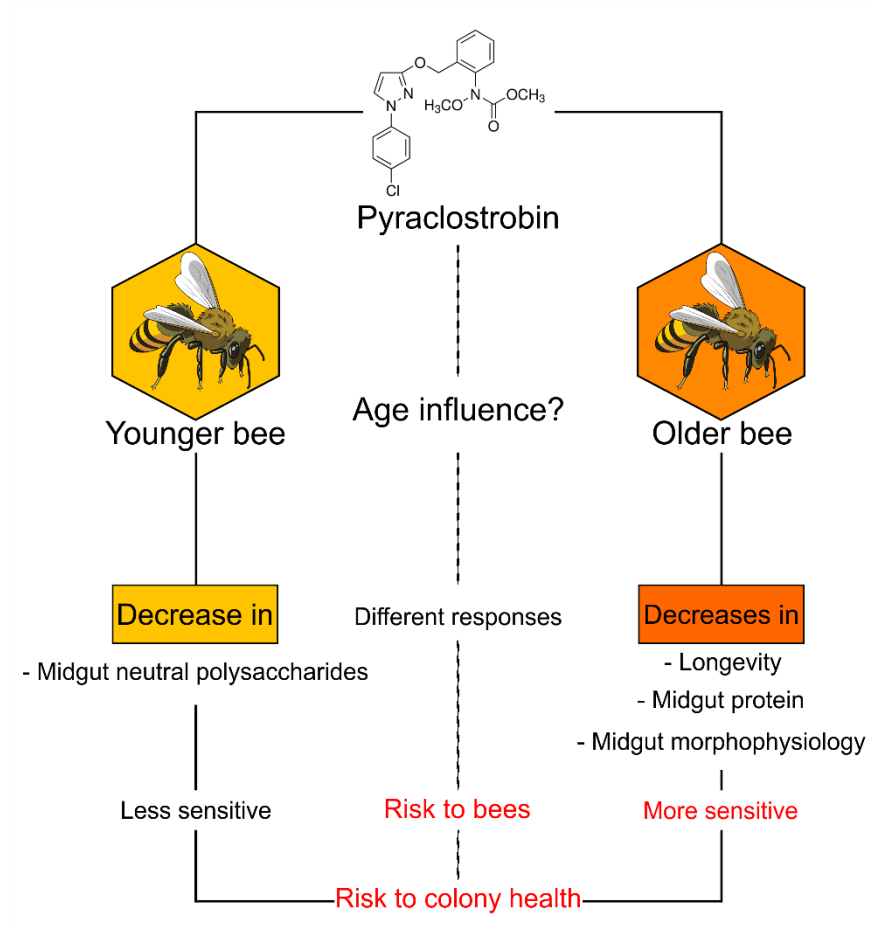
[☆] This paper has been recommended for acceptance by Christian Sonne.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115267>

### **HIGHLIGHTS**

- Response to pyraclostrobin is different according to the age in honeybee workers.
- Pyraclostrobin reduce honeybee foragers longevity at residual concentrations.
- Pyraclostrobin chronic exposure changed the midgut morphophysiology of foragers.
- Foragers are more sensitive to the fungicide than young workers honeybees.
- Pyraclostrobin reduce polysaccharides labeling in young workers midgut.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ABSTRACT

The honeybee has economic importance both for the commercial value of bee products and for its role in the pollination of agricultural crops. Despite the fact that the fungicides are widely used in agriculture, studies comparing the effects of this group of pesticides on bees are still scarce. There are many gaps preventing the understanding of bees' responses to exposure to fungicides, including the influence of the age of the exposed workers. However, this study aimed to compare the effects of residual concentrations of pyraclostrobin on young and old bees of Africanized *Apis mellifera*. The parameters analyzed were the survival rates, as well as the histopathological and histochemical changes in midgut of orally exposed workers to different sublethal concentrations of this strobilurin fungicide: 0.125 ng a.i./ $\mu$ L (C1), 0.025 ng a.i./ $\mu$ L (C2) e 0.005 ng a.i./ $\mu$ L (C3). The results showed a significant decrease in the longevity only for old bees exposed to the three concentrations of pyraclostrobin. After the five-day exposure period, the fungicide induced sublethal effects in the midgut only from the old bees. These effects were the increase both in cytoplasmic vacuolization of digestive cells and morphological changes in the nests of regenerative cells, which reflected in the higher lesion index of organ for groups C1 and C2. Additionally, there was a reduction in total protein staining in the intestinal epithelium in C1 and C2. At the same exposure period, the midgut of young bees presented only a reduction in the staining of neutral polysaccharides in the group C1. Concluding, old workers are more sensitive to the fungicide than young workers. This study showed different responses according to worker age, which can affect the maintenance of colony health. Future studies should take into account the age of the workers to better understand the effects of fungicides on bees.

**Keywords:** *Apis mellifera*; strobilurin fungicide; longevity; midgut; morphophysiology.

**The response to exposure to the fungicide pyraclostrobin was different according to bee's age. However, both ages were harmed that can compromise the health status of the colony.**

## 1. Introduction

Bees perform important ecosystem pollination services (Hung et al., 2018). The honeybee, *Apis mellifera* L., is the managed species best known worldwide because of the economic value of bee products and the pollination of several crops (Calderone, 2012; Sáez et al., 2020), since this species is generalist in the search for resources (Malaspina and Stort, 1987) and has a wide geographical distribution (Kotthoff et al., 2013).

Deforestation and habitat fragmentation leads to scarcity of floral resources for bees, as well as the intensified use of pesticides in agriculture and the infection by pathogens, have threatened populations of wild and managed bees (Goulson et al., 2015). For the last two decades, several studies have reported colony losses in managed honeybees in Europe (Gray et al., 2019; Chauzat et al., 2010; Genersch et al., 2010; Potts et al., 2010) and United States of America (Kulhanek et al., 2017; Lee et al., 2015; Ellis et al., 2010), and the weakening of honeybees colonies in Brazil (Castilhos et al., 2019; Pires et al., 2016). Although the causes of the decline in bee populations are multifactorial (Goulson et al., 2015), pesticides are among the most relevant and threatening due to the foraging of these bees in agricultural areas and their surroundings.

Wood and Goulson (2017) point out that studies on the effects of pesticides on bees were wholly directed to neonicotinoid, from 1995 to 2016, intensifying in the last three years of this period (correspondent to 59.4% of the total studies). However, studies of the effects of fungicides on bees have not had the same growth and, although they have increased in recent years, there are still many knowledge gaps that need to be clarified to understand their effects on this important non-target organism (Cullen et al., 2019).

In the field, bees may be exposed to fungicides either by direct contact at the time of spray application, or through their residues in pollen, nectar and water (Jaffe et al., 2019; Samarghandi et al., 2017; Pettis et al., 2013). In Brazil, there are 24 commercial formulations containing the fungicide pyraclostrobin as an active ingredient, which are used in crops such as cotton, peanuts, coffee, sunflower, apple, papaya, mango, melon, peach, pepper and tomato (Mapa, 2020).

The fungicidal activity of the strobilurin occur due to their ability to inhibit the mitochondrial respiration by the binding in Q<sub>0</sub> site (quinone oxidase) of the cytochrome b, which is located in the inner membrane of the mitochondria of fungi and other eukaryotes (Bartlett, 2002). In non-target organisms, such as insects, the fungicide pyraclostrobin has the potential to affect the mitochondrial bioenergetics of silkworms (Nicodemo et al., 2018), and



it strongly inhibited mitochondrial oxidation rates *in vitro*, i.e., in the mitochondria isolated from the flight muscle of the honeybee *A. mellifera* (Campbell et al., 2016).

Due to the large number of products formulated containing strobilurin as active principle applied, the risk of exposure to bees becomes more frequent on crops worldwide. In the case of eusocial bees, it is important to understand the possible sublethal effects of fungicides throughout their life span, as workers can potentially have different detoxifying response according to bee's age (Vannette et al., 2015). Glutathione S-transferase (GST) plays a role in the detoxification of xenobiotics in the midgut and its activity fluctuate during the life span of *A. mellifera* worker increasing until 21 days-old bees (Diao et al., 2005). Transcripts of genes encoding P450 xenobiotic detoxification enzymes that oscillated in both nurses and foragers (Rodrigues-Zas et al., 2012).

In this context, it is important to study organs that participate in the route of absorption and metabolism of pesticide residues, after oral ingestion. The intestine of social bees - anatomically divided into anterior, middle and posterior (Cruz-Landim and Rodrigues, 1967; Ferreira and Cruz-Landim, 2004) - is a key organ in the evaluation of the sublethal effects of fungicide residues present in the food because it performs the functions of ingestion, digestion of food and absorption of its nutrients (Snodgrass, 1956; Serrão and Cruz-Landim, 1996). Additionally, midgut plays a role of detoxification of xenobiotics present in ingested food by means of enzymes as cytochrome P450 (Mao et al., 2011), GST (Diao et al., 2005) and carboxylesterases (Rand et al., 2015). Therefore, morpho-physiological changes in the intestine induced by pesticide residues present in the food ingested by the bee can affect the gut's functions.

Malaspina and Silva-Zacarin (2006) highlighted the importance of using cell biomarkers in the internal organs of bees as a complementary tool in toxicological studies, in order to evaluate the responses of bees exposed to xenobiotics. The epithelium of the midgut consists of three cell types. The digestive cells that are responsible for the secretion of enzymes and components of the peritrophic matrix and absorption of nutrients from the digested food. The endocrine cells that are responsible for the production of peptides with hormonal action (act in peristalsis, digestion, and diuresis). The regenerative cells, which are undifferentiated cells capable of replacing the other two cell types when differentiating, maintaining the renewal and integrity of the epithelium (Martins et al., 2006; Terra, 2001; Cavalcante and Cruz-Landim, 1998; Landim et al., 1996).

Studies have shown that fungicides can reduce bee survival (Domingues et al., 2017), interfere with the immune response (Degrandi-Hoffman et al., 2015), compromise organs (Batista et al., 2020; Carneiro et al., 2020; Zaluski et al., 2017) and trigger late effects after their exposure in the larval phase (Tadei et al., 2019). Nevertheless, there are gaps in knowledge that prevent the understanding of differences in responses between different phases of life of workers of honeybees exposed to fungicides.

Therefore, to clarify the above-mentioned gaps, the objective of this study is to evaluate and compare the effects of oral exposure to sublethal concentrations of pyraclostrobin in newly emerged and forager bees of Africanized *A. mellifera*, under different parameters of analysis, specifically survival rate, as well as histopathological and histochemical analyzes of the midgut.

## 2. Materials and Methods

In this study, nine colonies of Africanized *A. mellifera* free of symptomatic disease and parasites were inside the apiary (22°23'48.1"S; 47°32'33.1"W) located at Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - *campus* of Rio Claro, São Paulo State, Brazil. The toxicological bioassays using newly emerged and forager bees were performed in laboratory (LECA - Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas) at the CEIS (Centro de Estudos de Insetos Sociais) from UNESP.

### 2.1. Fungicide

The pyraclostrobin fungicide analytical standard purchased from Sigma-Aldrich (CAS Number 175013-18-0,  $\geq 98\%$  purity) was used in the present study. The pyraclostrobin stock aqueous solution (1000 ng a.i./mL) was prepared with autoclaved distilled water and acetone (60% - 40%, respectively). Serial dilution was performed to obtain working solutions needed for continuous oral exposure.

The choice of three sublethal concentrations of pyraclostrobin in the present study was based on studies with fungicide residues found both in pollen (Pettis et al., 2013) and in bee bread samples (Yoder et al., 2013). Additionally, the concentrations used in laboratory tests with larvae of Africanized honeybee (Tadei et al., 2019) and adult workers of *A. mellifera* (Zaluski et al., 2017) were taken into account, with varying study ranges between 319 - 5000 ppb.

## 2.2. Toxicological bioassays

### 2.2.1. Experimental design

The toxicological bioassays have been designed so that the bees were distributed into the following experimental groups for each age: control (CTL) - bees received only syrup; concentration 1 (C1) - 0.125 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin in syrup; concentration 2 (C2) - 0.025 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin in syrup; concentration 3 (C3) - 0.005 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin in the syrup. The concentration of pyraclostrobin in C1 group is five times higher than C2, which is five times higher than C3 group. Since pyraclostrobin is not completely soluble in water, its dilution was carried out in acetone (solvent) and, however, the acetone control group (CAC) was included, in which the acetone concentration (< 0.01%) was similar to the C1 groups, C2 and C3, not exceeding 1% of the final volume according to the recommendations of OECD 213 (1998).

Five replicates were tested per experimental group, that is, five beecages/group containing 20 bees of the same colony in each beecage, totaling 100 bees per group (500 bees per age). In order to guarantee replicability and validate the results, bioassays were performed three times using three different colonies in each bioassay.

### 2.2.2. Bioassays: newly emerged and forager bees

In order to collect the newly emerged workers of Africanized *A. mellifera* from three different colonies, one frame containing capped brood cells were taken from each colony, and they were transported to the laboratory, where they were individually placed inside an incubator at 33 °C ( $\pm$  1) and 70% ( $\pm$  5) relative humidity. After emergence at laboratory conditions, the 24-hour-old bees from each colony were transferred to the beecages (plastic pots, 250 mL, 9 cm x 7 cm) that contained feeders with syrup inside (50% inverted sugar + 50% water, v:v) provided *ad libitum* during the 24-hour period that correspond to the acclimation time. Thus, the newly emerged bees were distributed per colony in five beecages (described in item 2.2.1.).

The collection of Africanized *A. mellifera* foragers was carried out using beecages, positioned directly at the entrance of each colonies between 7:00 - 9:00 a.m. and with temperatures around 20 °C. After collection of bees from the three different colonies, the beecages were transported to the laboratory and placed in an incubator, under the same

conditions described for the newly emerged worker bees. The feeders with syrup offered at the time of collection was removed from beecages at 4-6 hours before the beginning of the bioassays for both ages.

Mortality was recorded daily during the bioassay period. The results showed a marked decline in survival in forager bees on the fifth day of continuous oral exposure. Thus, to standardize the exposure time for both ages, this exposure time was chosen, i.e., five days.

### *2.3. Histological procedure of midguts*

After five days of exposure, 10 bees from each experimental group of both ages (newly emerged and forager bees) were collected, anesthetized by cooling at 4 °C and dissected at room temperature. The midguts were immersed in 4% paraformaldehyde buffered fixative solution in phosphate buffer saline (0.1 mol/L, pH 7.4) for a period of 24 h at 4 °C and then dehydrated with ethanol following the methodology described by Silva-Zacarin et al. (2012). After dehydration, the organs were embedded in historesin following the manufacturer's instructions (Leica Historesin Embedding Kit) and submitted to the microtomy to obtain 6 µm thick histological sections, which were stained with hematoxylin and eosin for morphological analysis (Domingues et al., 2017).

On average, 200 non-sequential histological sections were analyzed and photo-documented per experimental group of both ages, totaling 2000 images, under bright field light microscope. For histochemical analyzes, the midgut histological sections were submitted to the techniques of bromophenol blue for detection of total proteins (Pearse, 1985; Junqueira and Junqueira, 1983) and periodic acid-Schiff (PAS) for detection of neutral polysaccharides and glycoconjugates (Mcmanus, 1946).

### *2.4. Semi-quantitative analysis of midguts (lesion index)*

In order to quantify the possible adverse effects of pyraclostrobin concentrations in the midgut of newly emerged and forager bees, 10 slides were analyzed per experimental group of both ages, totaling 100 slides. The calculations of the histopathological changes detected in the intestine, as well as the lesion index of the organ were based on Oliveira et al. (2019), adapted from Grella et al. (2019) and Bernert et al. (1999). The classification of each change observed in the organ is depending on the degree and extent of this change: 0 = unchanged, 1 = slight occurrence, 2 = moderate occurrence and 3 = severe occurrence. The lesion

importance factor was classified as 1 = low pathological importance, reversible damage (apocrine secretion, cells eliminated into lumen), 2 = moderate pathological importance, repairable in most cases (cell vacuolization, atypical nuclei) and 3 = severe importance pathological, irreparable (pyknotic nuclei and damage in nest of regenerative cells).

### *2.5. Histochemical quantification*

To calculate the staining intensity of bromophenol blue and PAS, a total of 300 midgut images were measured by technique (150 for newly emerged and 150 for forager bees) using the particle analysis determination using the software ImageJ. The images of the midguts of the bees of each age were analyzed for each of the five experimental groups as described in the items (2.2.1.), being (n = 30) per group.

### *2.6. Statistical analysis*

A survival rate for each experimental group for newly emerged and forager bees was determined by Log-rank (Kaplan-Meier), followed by multiple comparison of groups by the Holm-Sidak method using SigmaPlot® 14.0 (Systat Software Inc). The data obtained in the present study were initially analyzed by the Shapiro-Wilk normality test. For the semi-quantitative analysis of midguts (lesion index) and histochemistry intensity, the Kruskal-Wallis non-parametric test was performed followed by the Dunn's post-test for multiple comparisons using the GraphPad Prism 8 (GraphPad Prism Software, Inc), with a significance level of  $P < 0.05$ . The data are graphically represented with mean  $\pm$  standard error.

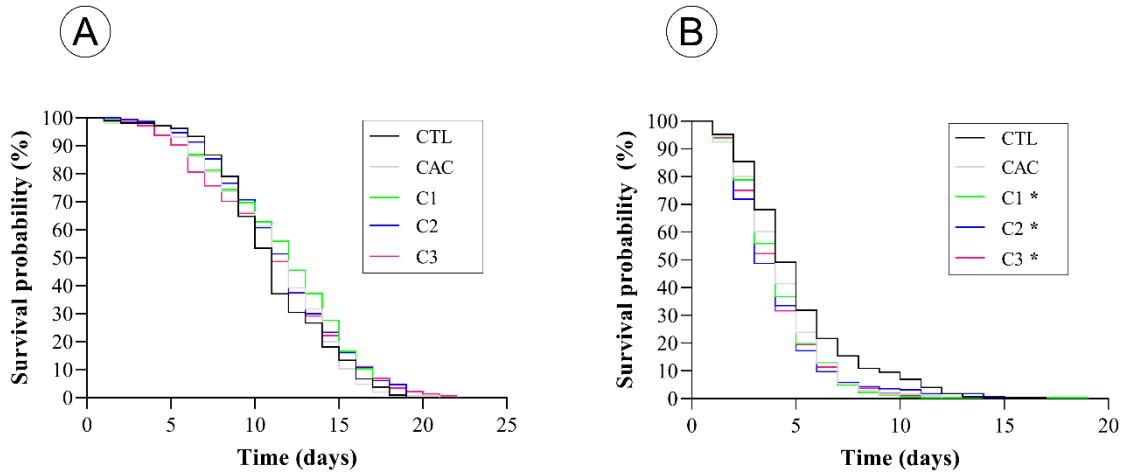
## **3. Results**

### *3.1. Survival rate*

The survival bioassays to different concentrations of pyraclostrobin showed different patterns of responses according to bee age, with 22 days for newly emerged workers and 19 days for foragers.

The concentrations of the fungicide did not affect the longevity of the newly emerged bees, compared to the control groups (Log-Rank Test: Statistic: 3555; DF: 4;  $P = 0.469$ ) (Fig. 1A). However, the longevity of forager bees in groups C1 ( $3.974 \pm 0.123$  days), C2 ( $4.011 \pm 0.147$  days) and C3 ( $4.046 \pm 0.126$  days) was lower than the CTL ( $5.018 \pm 0.169$  days) and

CAC ( $4.508 \pm 0.153$  days) ( $P < 0.05$ . Log-Rank Test: Statistic: 34.374; DF: 4; P Value  $< 0.001$ ) (Fig. 1B). Groups C1, C2 and C3 showed a reduction of 18.75% in survival in comparison to the CTL group, and 12.54% in survival compared to CAC.



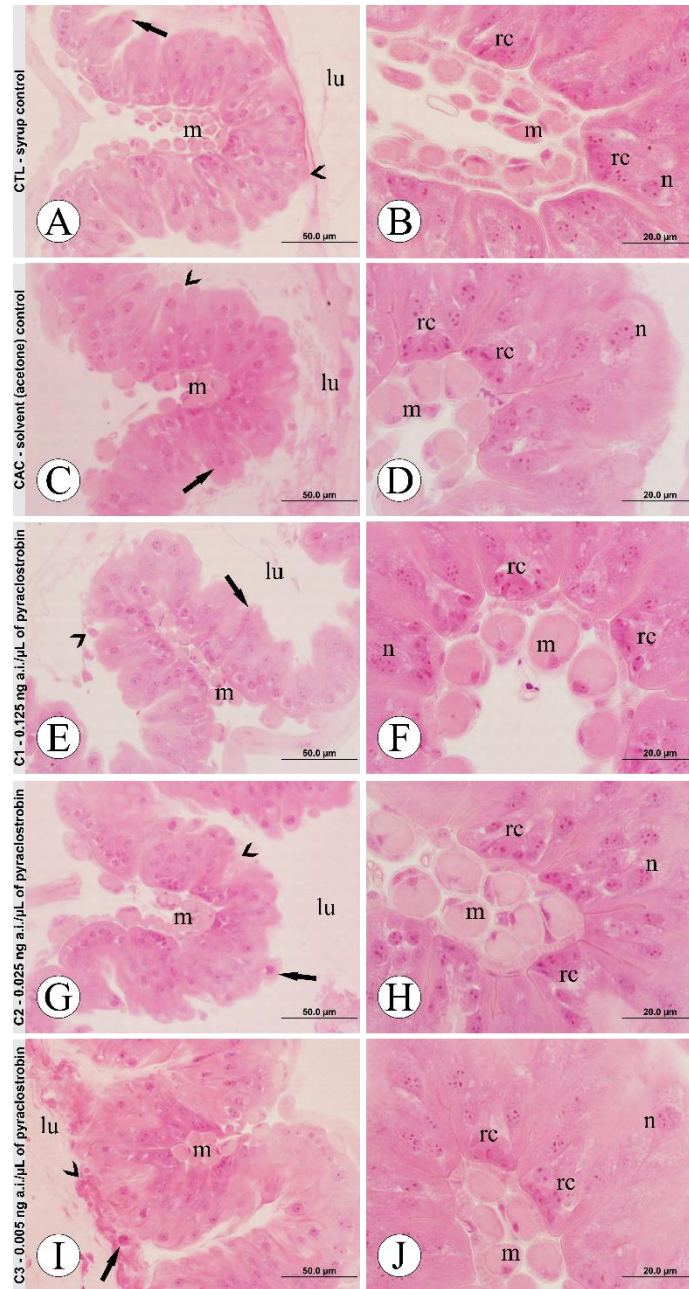
**Fig. 1.** Survival pattern of (A) newly emerged bees and (B) forager bees of Africanized *A. mellifera* exposed continuously to pyraclostrobin. N = 100 individuals per experimental group. Statistical difference in B, \*  $P < 0.05$ . Log-Rank Test: Statistic: 34.374; DF: 4; P Value  $< 0.001$ .

### 3.2. Morphological analysis

Histological analyzes of midguts of newly emerged workers exposed to pyraclostrobin for five days did not show morphological changes, so that all individuals in the exposed groups presented a similar morphological pattern to the control group (Fig. 2), with well-defined villi of the organ with a brush border clearly visible in the apical portion of the epithelium. Digestive cells (also known as principal or enterocytes) presented their cytoplasm without vacuolization. The nests of regenerative cells have normal morphology, i.e., they have large nuclei with decondensed chromatin and they are organized in the form of clusters visibly located in the basal portion of the epithelium, so that their apical edge does not reach the lumen of the villi.

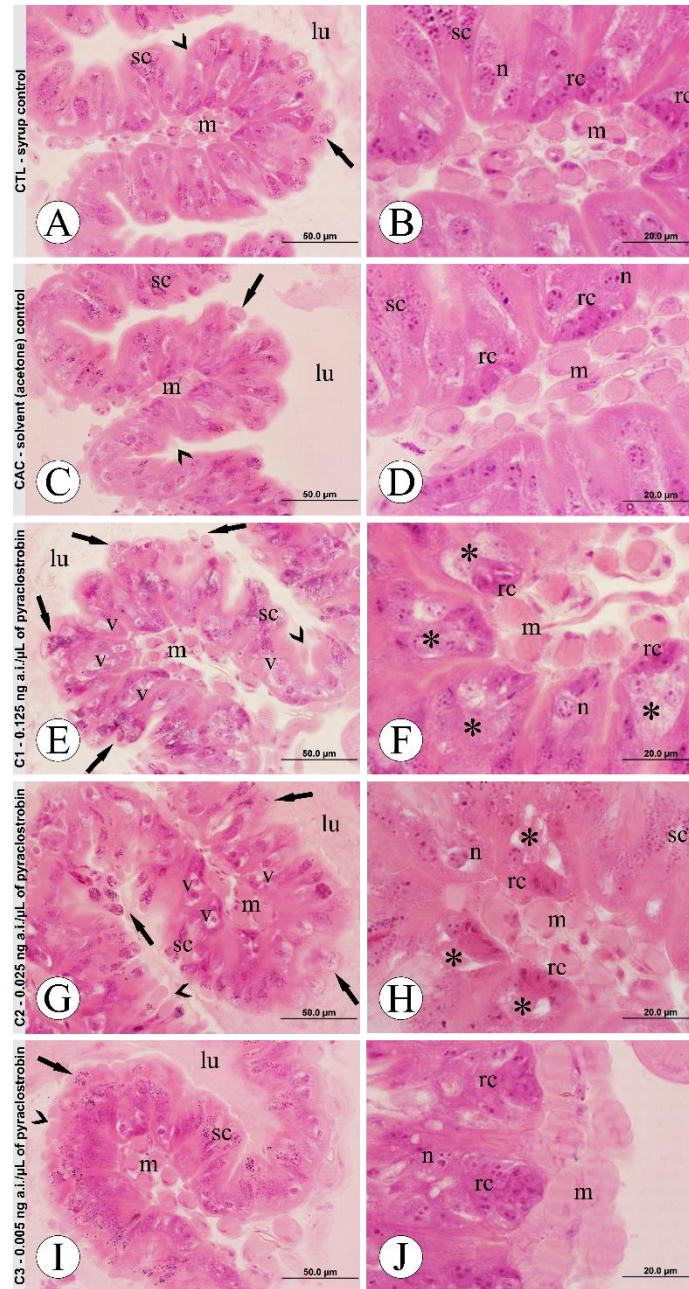
On the contrary, forager bees exposed for five days to pyraclostrobin presented morphological changes more pronounced in the midgut from groups C1 (Fig. 3E-F) and C2 (Fig. 3G-H) than in group C3 (Fig 3I-J), in comparison to CTL (Fig. 3A-B) and CAC (Fig. 3C-D) groups. These changes occurred mainly in the following histopathological parameters: epithelial cytoplasmic vacuolization, elimination of cells to the lumen and morphological alteration in the nests regenerative cells. In C1 (Fig. 3E) and C2 (Fig. 3G) it is possible to

observe a large amount of vacuoles in the epithelial digestive cells of the intestinal villi, which were not observed in the other groups and, additionally, digestive cells containing a large amount of inclusions (small granules of secretion/excretion) are being released into the lumen. In C1 (Fig. 3F) and C2 (Fig. 3H) we observed intense vacuolization in the nests of regenerative cells at the base of the epithelial tissue of the midgut. Eventually, atypical nuclei and pyknotic nuclei were detected in the midgut of groups C1 and C2, however these were not considered in determining response patterns (semi-quantitative analysis) due to their low frequency. The CTL and CAC groups, for both forager and newly emerged bees, showed a typical and uniform morphological pattern of the organ and the C3 group (Fig 3I-J) did not differ in relation to the control groups.



**Fig. 2.** Midgut of newly emerged bees of Africanized *A. mellifera* after five days of oral continuous exposure to pyraclostrobin. (A-B) CTL - syrup control; (C-D) CAC - solvent (acetone) control; (E-F) C1 - 0.125 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin; (G-H) C2 - 0.025 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin; (I-J) C3 - 0.005 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin. **Legend:** lu = lumen, m = muscle, n = nuclei, rc = regenerative cells, Head arrow = release of apocrine secretion, Black arrow = elimination of cells. Staining: Hematoxylin-Eosin.





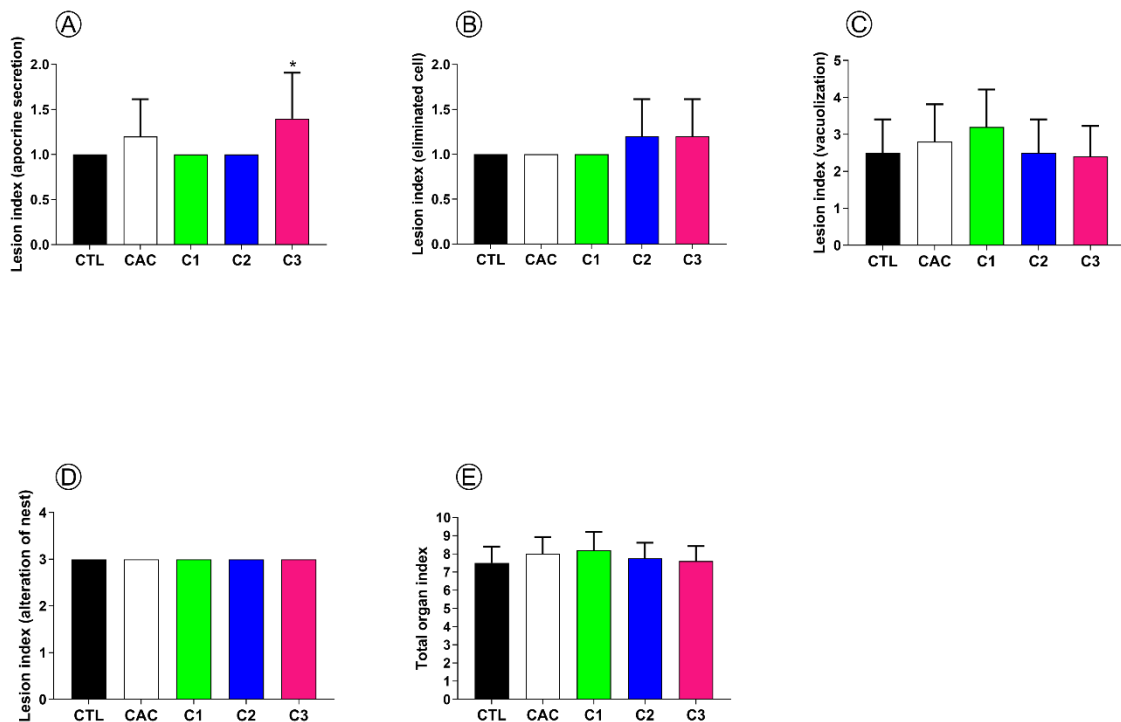
**Fig. 3.** Midgut of forager bees of Africanized *A. mellifera* after five days of oral continuous exposure to pyraclostrobin. (A-B) CTL - syrup control; (C-D) CAC - solvent (acetone) control; (E-F) C1 - 0.125 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin; (G-H) C2 - 0.025 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin; (I-J) C3 - 0.005 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin. **Legend:** lu = lumen, m = muscle, n = nuclei, rc = regenerative cells, sc = spherocrystals, v = vacuole, \* = vacuolization in the nest, Head arrow = release of apocrine secretion, Black arrow = elimination of cells. Staining: Hematoxylin-Eosin.

### 3.3. Lesion index

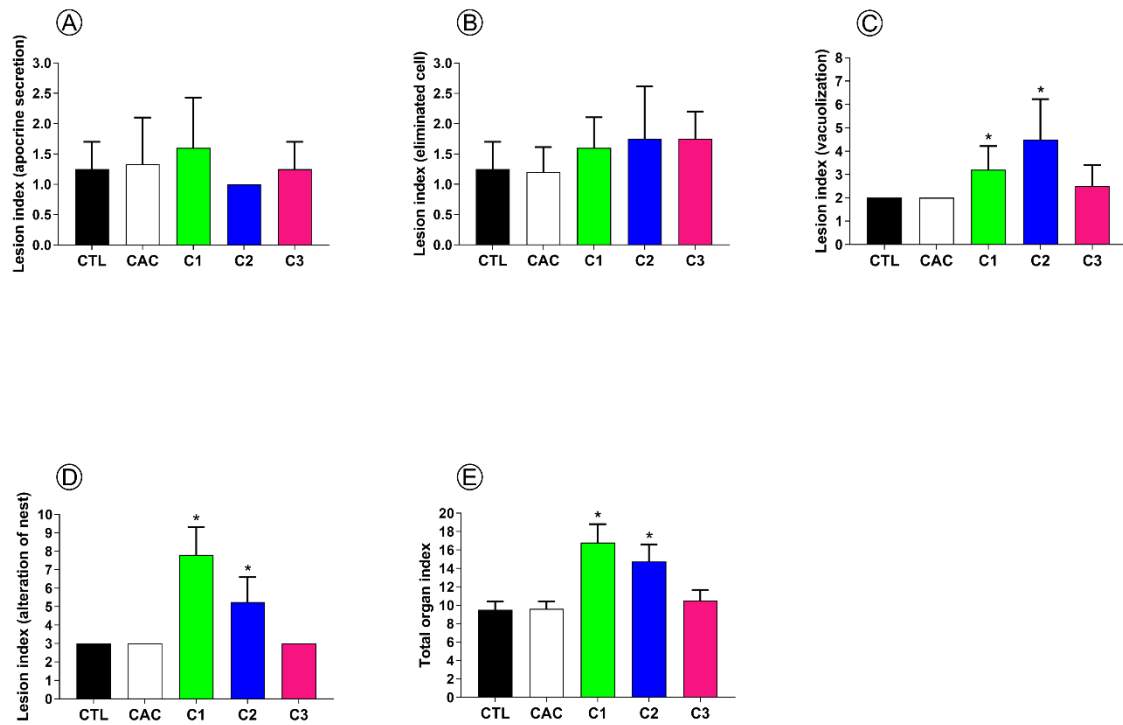
In order to quantify the changes observed in the histological analyzes and understand the response pattern of the exposed groups in relation to the control groups, the lesion index of the organ was determined (Figures 4 and 5).

In newly emerged bees, the C3 group ( $P = 0.0193$ ) demonstrated an increase in the apocrine secretion parameter (lesion degree: 1), in relation to the CTL and CAC groups (Fig. 4A). The total organ index (Fig. 4E), corresponding to the sum of all the parameters analyzed, showed that the groups did not present statistical differences among them ( $P > 0.05$ ).

In the forager bees (Fig. 5), all exposed groups showed similarity for the parameters of apocrine secretion (Fig. 5A) and cell elimination (Fig. 5B). However, the response of forager bees was different for the parameters of vacuolization (Fig. 5C), degree 2, and morphological alteration in the nests of regenerative cells (Fig. 5D), degree 3, which was reflected in the highest total organ index (Fig. 5E) of groups C1 ( $P < 0.0001$ ) and C2 ( $P < 0.0002$ ) in comparison to the others (CTL, CAC and C3). The C3 group (Fig. 5E) is statistically similar to the CTL and CAC groups ( $P > 0.05$ ). The parameters of atypical nuclei, degree 2, and pyknotic nuclei, grade 3, for both ages, did not show enough frequency for quantification and were not included in the lesion index results.



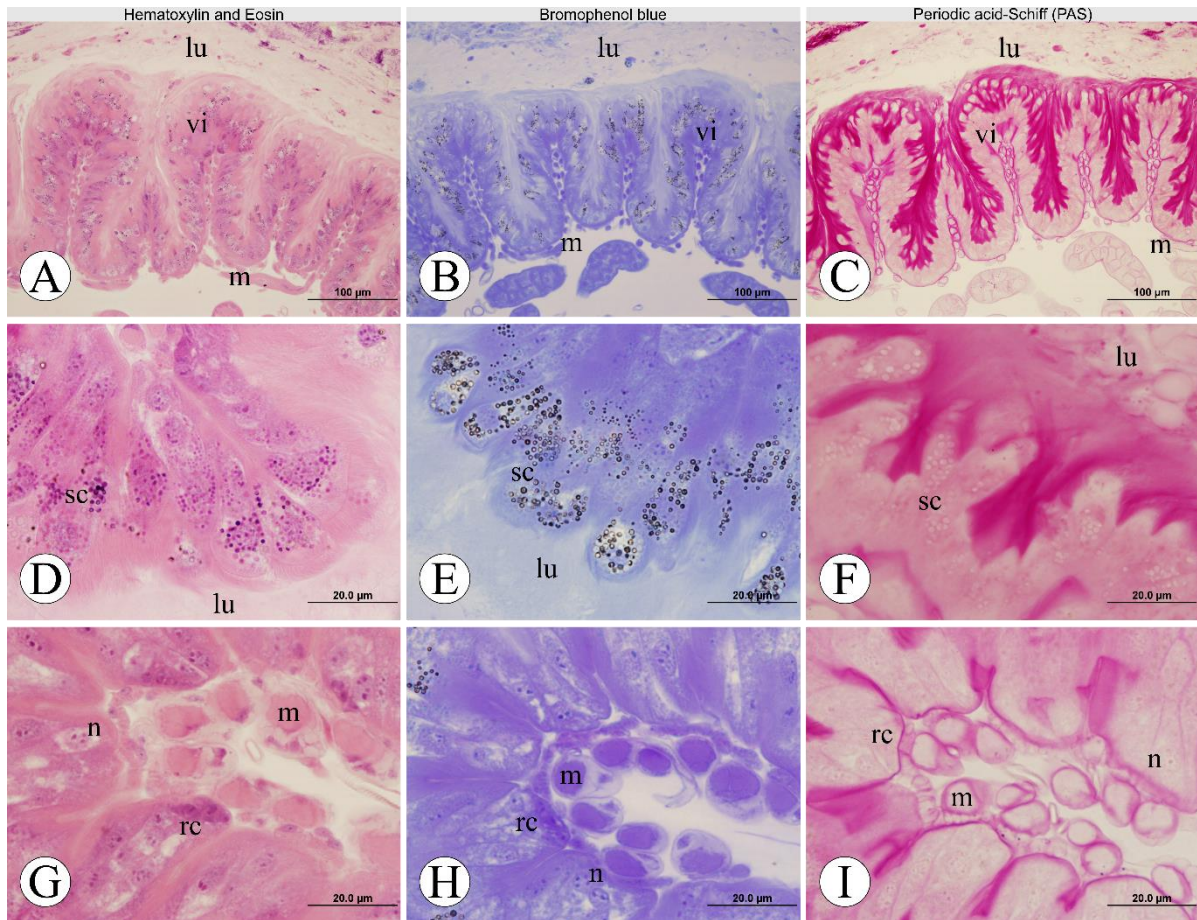
**Fig. 4.** Alterations and organ index in newly emerged bees. (A) Apocrine secretion; (B) Eliminated cell; (C) Vacuolization; (D) Alteration of nest; (E) Total organ index. Statistical difference in A, \*  $P < 0.05$ .



**Fig. 5.** Alterations and organ index in forager bees. **(A)** Apocrine secretion; **(B)** Eliminated cell; **(C)**; Vacuolization; **(D)** Alteration of nest; **(E)** Total organ index. Statistical difference in C, D and E, \*  $P < 0.05$ .

#### 3.4. Histochemistry analysis

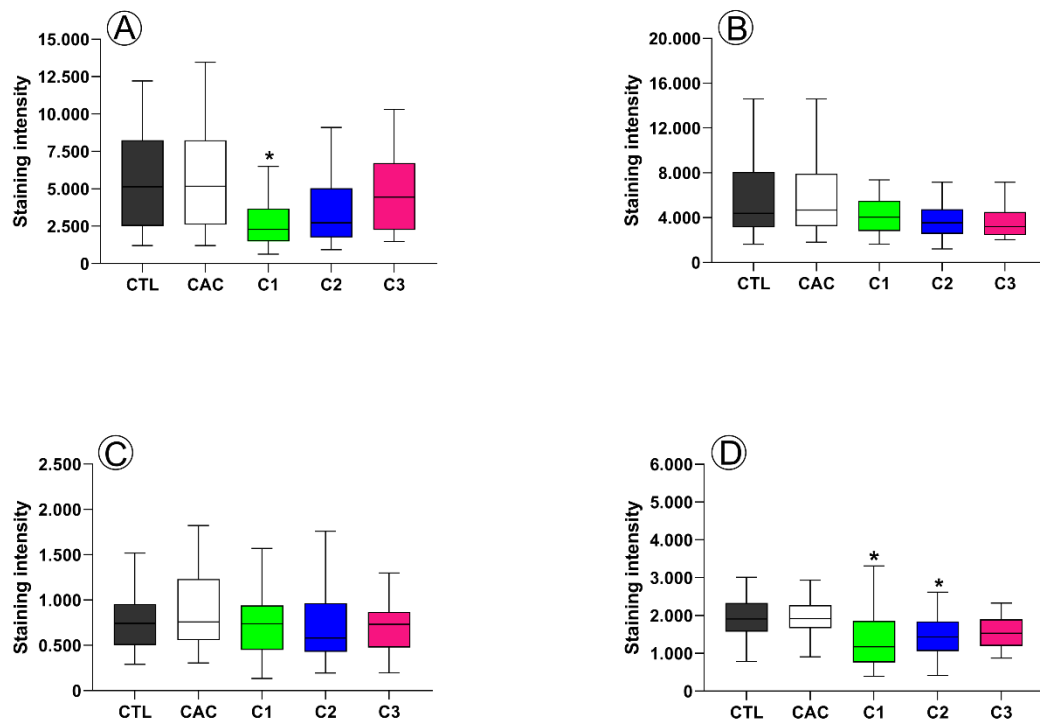
The data from the histochemical analyzes allowed to identify the different macromolecules distributed in the midgut. Figure 6 shows comparatively the hematoxylin and eosin staining for morphological analysis (Fig. 6A, 6D and 6G) and the tests for total proteins using bromophenol blue (Fig. 6B, 6E and 6H) and for neutral polysaccharides and glycoconjugates using the PAS (Fig. 6C, 6F and 6I) in the midgut.



**Fig. 6.** Villi of the midgut of forager bees stained with hematoxylin and eosin techniques (A, D and G), bromophenol blue (B, E and H) and PAS (C, F and I). Villi overview (A-C); Detailed view of digestive cells (D-F); Detailed view of regenerative cell nests (G-I). **Legend:** lu = lumen, m = muscle, n = nuclei, rc = regenerative cells, sc = spherocrystals, vi = villus.

The response pattern for the two histochemical techniques used in the present study was different in both ages, as shown in Figure 7 (A-D). In newly emerged workers, the C1 group ( $P = 0.0002$ ) showed a reduction in the positive labeling in the PAS reaction in relation to the CTL and CAC groups (Figure 7A). Although the C2 group also showed a reduction in this labeling intensity, there was no statistical difference in relation to the other groups ( $P = 0.0746$ ). In forager bees, although figure (7B) shows less positive labeling for PAS in groups C1, C2 and C3, there was no statistical difference between groups ( $P > 0.05$ ).

Positive labeling for total proteins by the bromophenol blue technique, unlike PAS, did not show any difference in intensity between the groups of newly emerged bees ( $P > 0.05$ ) (Figure 7C). However, in the forager bees, a marked reduction in this positive labeling intensity was observed, with statistical difference in groups C1 ( $P = 0.0009$ ) and C2 ( $P = 0.0205$ ) when compared with the CTL and CAC groups (Figure 7D). Group C3 showed a decline in labeling intensity, but without statistical difference ( $P > 0.05$ ).



**Fig. 7.** Boxplot of the histochemical alterations in Africanized *A. mellifera* midguts after five days of oral continuous exposure to pyraclostrobin. **(A)** PAS labeling in the midgut of newly emerged bees; **(B)** PAS labeling in the midgut of forager bees; **(C)** Bromophenol blue staining in the midgut of newly emerged bees; **(D)** Bromophenol blue staining in the midgut of forager bees. Asterisks indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) to the control groups.

#### 4. Discussion

In the present study, we demonstrate that exposure of Africanized *A. mellifera* to a range of field-realistic concentrations of pyraclostrobin, including that representative of the worst-case scenario, decreases the survival of forager bees. In addition, the fungicide induced both the histochemical changes in the midgut of exposed workers, as newly emerged as forager bees, and histopathological effects only in foragers, although in different ways, which can compromise the morphophysiology of the midgut. Studies with other pesticides have also shown that foragers were more susceptible to the pesticides (4-fold greater effect) than in-hive bees (Tosi and Nieh, 2019).

According to Seeley (1994), foragers play an essential role in resources' collection such as pollen, nectar, water and resin, and in gathering information from the environment for transmitting the source of resources to individuals within the colony, in the form of waggle dances (Couvillon et al., 2012; von Frisch and Jander 1957; von Frisch, 1946). The foraging

skills of these individuals are increased with aging (Dukas and Visscher, 1994). Therefore, the reduction in the survival time of foragers exposed to pyraclostrobin can cause serious damage to the colony, such as a decrease in the entry of resources and interruption of the transmission of information about the environment (waggle dance). Indirect effects can be also observed, such as reduction in offspring caused by decreased pollen stored, as demonstrated by Allen and Jeffree (1956), in addition to the potential impact on the health of the colony due to a possibly less diversified diet (Alaux et al., 2010).

External disturbances can modulate the division of tasks of young workers, so that changes in the population dynamics of the colony takes place (Robinson, 1992; Huang and Robinson, 1999), but this modulation may not be enough to recover the colony if the level of disturbance causes a high degree of impact in the reorganization of worker tasks. Thus, although pyraclostrobin has not reduced the survival of newly emerged workers, the fact that this fungicide has reduced the survival of foragers may compromise the activities of young workers because they can be recruited to forager at an earlier age. According to Khoury et al. (2011), due to a high mortality rate of foragers in the colony, young workers become foragers earlier, which leads to a compromise in colony growth, in addition to the fact that early foragers are not as effective in collecting resources. Carneiro et al. (2020) also reported absence of mortality in newly emerged workers of *A. mellifera* exposed to the fungicide iprodione for the period of 12 h and 24 h.

Some studies report an increase in the mortality of young and old bees after exposure to isolated or combined fungicides (Tadei et al., 2019; Berg et al., 2018; Domingues et al., 2017; Fisher et al., 2017), demonstrating the toxicity of these pesticides corroborating with our findings that showed the adverse effects of pyraclostrobin in both ages. According to Degrandi-Hoffman et al. (2015), fungicides can still cause indirect effects on bees, compromising the integrity of the immune system, which makes them more susceptible to parasites and pathogens, weakening the colony. This greater susceptibility confirms the data obtained by Pettis et al. (2013) that demonstrated the highest relative risk (95% CI) for pyraclostrobin (2.85) and, in addition, bees that consumed pollen with a high amount of the fungicides pyraclostrobin and chlorothalonil presented a high probability of infection by the intestinal parasite *Nosema* ssp.

Under normal conditions, due to the secretory function of midgut digestive cells, inclusions can appear in the form of vacuoles or granules (Terra and Ferreira, 2012), and spherocrystals (Carneiro et al., 1997). In the present study, the increase in vacuolization in the

digestive cells and elimination of epithelial cells into the lumen, as well as the morphological pattern alteration of the regenerative cell nests, are indicative of cytotoxic effects induced by pyraclostrobin in groups C1 (0.125 ng ai/ $\mu$ L) and C2 (0.025 ng ai/ $\mu$ L). Batista et al. (2020), detected the presence of cytoplasmic vacuolization in midgut during 72 h and 96 h of oral exposure in newly emerged workers of *A. mellifera* exposed to the fungicide picoxystrobin at a concentration of 18ppb (0.018 ng/mL). Carneiro et al. (2020) demonstrated that after oral exposure to LD<sub>50</sub> of the fungicide iprodione, young workers of *A. mellifera* had an increase in the frequency of cytoplasmic vacuoles in digestive cells over time of exposure (12 h and 24 h), corresponding to degeneration of the endoplasmic reticulum, observed in the cytoplasm of these cells at an ultrastructural level. However, in the present study, we only observed cytoplasmic vacuolization in forager bees after five days of exposure, probably due to the very low concentrations of the fungicide. Anyway, vacuolization has moderate pathological importance because it can be reversible (Oliveira et al., 2019; Grella et al., 2019).

The elimination of digestive cells into the lumen is a natural process that occurs when cells are no longer able to perform the physiological functions, either by damage caused during the performance of their activities or by the process of cellular senescence. Although digestive cell death is a natural event, some chemicals increase cell death, which may compromise digestion and nutrient absorption (Carneiro et al., 2020; Catae et al., 2014). Thus, these released cells are replaced by regenerative cells that differentiate themselves to replace them (Serrão and Cruz-Landim, 1996). However, according to Fernandes et al. (2010; 2012), regenerative cells do not undergo division in adults and their number decreases as digestive cells are replaced with age. Therefore, as the damage caused by fungicide exposure (C1 and C2 groups) in the nests of regenerative cells of midgut from forager bees are severe and irreversible, which were reflected in the lesion index of organ, there is the possibility of compromising the physiology of midgut. Thus, food digestion and nutrient absorption can be compromised because there would not be enough cell replacement in the midgut epithelium, potentially decreasing its functionality. Some studies have described similar changes in digestive cells and in nests of regenerative cells caused by fungicides (Batista et al., 2020; Carneiro et al., 2020) and other pesticides (Oliveira et al., 2019; Gregorc et al., 2018; Aljedani, 2017; Catae et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Kakamand et al., 2008).

Digestive cells have high secretory activity due to their well-developed rough endoplasmic reticulum and Golgi complex (Cruz-Landim, 2009; Cavalcante and Cruz-Landim, 1998) and participate in the synthesis of components of a very important structure

present in the intestine, the peritrophic membrane (Terra, 2001). This membrane consists of chitin, glycosaminoglycans, glycoproteins and proteins that forms a matrix, and separates the food content of the lumen from the intestinal epithelium. Some of the peritrophic membrane's functions are its performance as a physical barrier, protecting epithelial cells from the mechanical action of food and against parasites and bacteria, in addition to participating in the absorption of nutrients (Cruz-Landim, 2009; Terra, 2001; Lehane, 1997; Brandt et al., 1978).

Glycosaminoglycans and glycoproteins of the peritrophic matrix, which are synthesized and secreted by midgut digestive cells, are positive to PAS staining. Thus, histochemical analyzes that showed lower intensity of PAS-positive labeling (fungicides groups) may indicate decreased secretion activity by digestive cells in newly emerged workers. This fact may impair the synthesis of polysaccharide components of the peritrophic matrix and, consequently, interfere negatively in the digestive process (the matrix forms a framework for the extracellular digestive enzymes play their role), decrease the protection of the mechanical action of food and make the midgut more susceptible to the entry of bacteria and pathogens, compromising the individual's fitness. However, the data from the present study showed that the survival of young bees was not compromised, despite these histochemical changes, and there was no evidence of changes in midgut morphology. Thus, it is suggested that the absence of diminution in the longevity of these exposed bees is due to the recovery of the midgut of newly emerged bees. Our data corroborates to those obtained by Batista et al. (2020) that demonstrate recovery of the damage induced by the fungicide picoxystrobin (strobilurin) in the midgut of the newly emerged workers of *A. mellifera*. According with these authors, these damages occurred in the first two days of oral exposure (24 h and 48 h), with midgut recovery being observed with progressive decrease in lesions at 72 h and 96 h after exposure. Catae et al. (2014) also reported the recovery of midgut after injury in newly emerged honeybee exposed orally to the insecticide thiamethoxam.

Contrary to the newly emerged bees, the intensity of the positive marking for PAS (indicative of neutral polysaccharides and glycoconjugates) did not decrease in the forager bees, probably due to the shorter time of the intestinal transit of the syrup in the midgut (1 h) in relation to the time of this transit in the newly emerged (18 h) (Cruz-Landim, 2009). However, this shorter time of permanence of the food in the midgut was sufficient to cause the morphological damages induced by the absorbed fungicide in this organ. The probable absence of recovery of the intestinal epithelium is due to the decrease in the regenerative capacity of the midgut epithelium of foragers that is inherent to their aging process. Thus, the



data show that forager bees are less tolerant to the same concentrations of fungicides ingested by the newly emerged, as evidenced in the longevity bioassay.

In this sense, it is extremely relevant to evaluate different parameters of analysis at different ages of bees, both at cellular/tissue level (histopathology) with individual (longevity). In addition, it is important to emphasize that the newly emerged workers were evaluated in laboratory conditions, free of pathogens. Nevertheless, at field conditions, parasites and bacteria are usually present in honeybee colonies (Muli et al., 2014; Teixeira et al., 2013) and they can enter more quickly into the midgut of young bees that have had a decrease in secretion products that make up the protective barrier represented by the peritrophic matrix. Therefore, future studies on the interaction of pathogens and fungicides (strobilurin family) may elucidate how much this reduction in polysaccharides of the peritrophic matrix, observed in the present study, can compromise the health of these bees in field conditions.

About the histochemical data related to total protein labeling, only forager bees presented spherocrystals positive to proteins (bromophenol blue) in the cytoplasm of the digestive cells. Spherocrystals have proteins in their composition as described by Cruz-Landim (1971) for bee midgut. The spherocrystals are concentric granules rich in salts, metals and organic compounds that participate in excretion, being important in the osmoregulation mechanism in the midgut and, consequently, in the internal environment of the bee, as well as in the neutralization of toxic metabolism compounds (Silva-Zacarin et al., 2011; Cruz-Landim, 2009; Carneiro et al., 1997; Cruz-Landim and Serrão, 1997; Cruz-Landim, 1971). The decrease in the labeling intensity for bromophenol blue-positive spherocrystals found in forager bees from C1 and C2 groups might be related to changes in the midgut metabolism in relation to control. Midguts from these exposed-foragers may have their activities centralized in the detoxification process, which is one of its functions (Rand et al., 2015; Rodrigues-Zas et al., 2012; Mao et al., 2011), increasing the energy expenditure for this function instead of using it for the processes of excretion of metabolic products through spherocrystals. Consequently, this decrease in spherocrystals associated with the histopathological changes observed in midgut from exposed-foragers may have potentially compromised other essential functions of the midgut, such as food digestion and nutrient absorption, leading to a decline in longevity of these workers.

As here demonstrated, the adverse effects of fungicides on bee workers can potentially compromise their health and decrease their performance in the colony. The present findings

will help future studies evaluating several other environmental stressors such as fungicides, at the individual and colony level.

## 5. Conclusion

In conclusion, we demonstrated differences in responses between newly emerged and forager bees after exposure to pyraclostrobin for all parameters analyzed. These changes affect two extremely important ages in the colony, with the younger bees responsible for internal activities and the older bees responsible for resource collection.

Histopathological changes in midgut are sufficient to interfere, even indirectly, in the physiological processes of this organ that induced decrease of longevity of forager bees. The data presented here reinforce that the age of the workers must be taken into account in the ecotoxicological studies to better understand the pesticides effects on these non-target organisms.

### Author contribution

**Conceptualization:** Caio E. C. Domingues, Elaine C. M. Silva-Zacarin and Osmar Malaspina. **Data curation:** Caio E. C. Domingues. **Formal Analysis:** Caio E. C. Domingues and Lais V. B. Inoue. **Investigation:** Caio E. C. Domingues and Lais V. B. Inoue. **Methodology:** Caio E. C. Domingues and Lais V. B. Inoue. **Resources:** Elaine C. M. Silva-Zacarin and Osmar Malaspina. **Supervision:** Caio E. C. Domingues, Elaine C. M. Silva-Zacarin and Osmar Malaspina. **Validation:** Caio E. C. Domingues and Lais V. B. Inoue. **Writing - Original Draft Preparation:** Caio E. C. Domingues and Elaine C. M. Silva-Zacarin **Writing -Review & Editing:** Caio E. C. Domingues, Lais V. B. Inoue, Elaine C. M. Silva-Zacarin and Osmar Malaspina. **Project Administration:** Caio E. C. Domingues and Elaine C. M. Silva-Zacarin. **Funding Acquisition:** Elaine C. M. Silva-Zacarin and Osmar Malaspina.

### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

We thank the beekeeper Antonio Sergio Pascon for maintaining hives and collecting bees, Gerson Mello Souza for support in histochemistry techniques and Patricia Azevedo for assistance in histochemical analysis. We also thank the “Brazilian National Council for Scientific and Technological Development” (CNPq) [grant number 400540/21097-3]. This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant numbers 2016/15743-7, 2017/21097-3].

## References

- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y., 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biol. Lett.* 6, 562-565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Aljedani, D.M., 2017. Effects of abamectin and deltamethrin to the foragers honeybee workers of *Apis mellifera jemenatica* (Hymenoptera: Apidae) under laboratory conditions. *Saudi. J. Biol. Sci.* 24, 1007-1015. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.007>
- Allen, M.D., Jeffree, E.P., 1956. The influence of stored pollen and of colony size on the brood rearing of honeybees. *Ann. Appl. Biol.* 44, 649-656. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1956.tb02164.x>
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest. Manag. Sci.* 58, 649-662. <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Batista, A.C., Domingues, C.E.C., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M., 2020. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? *J. Apic. Res.* 59, 1-10. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>
- Berg, C., Hill, M., Bonetti, C., Mitchell, G.C., Sharma, B., 2018. The effects of iprodione fungicide on survival, behavior, and brood development of honeybees (*Apis mellifera* L.) after one foliar application during flowering on mustard. *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 3086-3094. <https://doi.org/10.1002/etc.4272>
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish. Dis.* 22, 25-34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>
- Brandt, C.A., Adang, M.J., Spence, K.D.I., 1978. The peritrophic membrane: Ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgia pseudotsugatai*. *J. Invert. Pathol.* 32, 12-24. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(78\)90169-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90169-6)
- Calderone, N.W., 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992–2009. *PloS One* 7, 1-27.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037235>

Campbell, J.B., Nath, R., Gadau, J., Fox, T., Degrandi-Hoffman, G., Harrison, J.F., 2016. The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. *J. Insect. Physiol.* 86, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.003>

Carneiro, F.G. et al., 1997. Preliminary study of spherocrystals present in different groups of insects. *Acta Microsc.* 6, 592-593.

Carneiro, L.S., Martínez, L.C., Gonçalves, W.G., Santana, L.M., Serrão, J.E., 2020. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotox. Environ. Safe* 189, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>

Castilhos, D., Bergamo, G.C., Gramacho, K.P., Gonçalves, L.S., 2019. Bee colony losses in Brazil: a 5-year online survey. *Apidologie* 50, 263-272. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00642-7>

Catae, A.F., Roat, T.C., Oliveira, R.A., Nocelli, R.C., Malaspina, O., 2014. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 77, 274-281. <https://doi.org/10.1002/jemt.22339>

Cavalcante, V.M., Cruz-Landim, C., 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia* 24, 19-40.

Chauzat, M.-P., Martel, A.-C., Zeggane, S., Drajnudel, P., Schurr, F., Clément, M.-C., Ribière-Chabert, M., Aubert, M., Faucon, J.-P., 2010. A case control study and a survey on mortalities of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in France during the winter of 2005-6. *J. Apic. Res.* 49, 40-51. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.06>

Couvillon, M.J., Pearce, F.C.R., Harris-Jones, E.L., Kuepfer, A.M., Mackenzie-Smith, S.J., Rozario, L.A., Schürch, R., Ratnieks, F.L.W., 2012. Intra-dance variation among waggle runs and the design of efficient protocols for honey bee dance decoding. *Biol. Open* 1, 467-472. <https://doi.org/10.1242/bio.20121099>

Cruz-Landim, C. 1971. Note on granules with concentric lamination present in the larval midgut of *Trigona (Scaptotrigona) postica* Latr. (Hym, Apidae). *Rev. Bras. Pesquisas Méd. Biol.* 4: 13-16.

Cruz-Landim, C., Rodrigues, L., 1967. Comparative anatomy and histology of the alimentary canal of adult Apinae. *J. Apic. Res.* 6, 17-18. <https://doi.org/10.1080/00218839.1967.11100156>

Cruz-Landim, C., Serrão, J.E., 1997. Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera, Apidae). *Neth. J. Zool.* 41, 1-9.

Cruz-Landim, C., 2009. *Abelhas: morfologia e funções de sistemas*, first ed. Editora Unesp, São Paulo.

- Cullen, M.G., Thompson, L.J., Carolan, J.C., Stout, J.C., Stanley, D.A., 2019. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. *PLoS One* 14, 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.022574>
- Degrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Watkins, D.E., Chambers, M.L., Hidalgo, G., 2015. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. *J. Econ. Entomol.* 108, 2518-2528. <https://doi.org/10.1093/jee/tov251>
- Diao, Q., Yuan, K., Liang, P., Gao, X., 2005. Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. *J. Apic. Res.* 45, 145-152. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101333>
- Domingues, C.E.C., Abdalla, F.C., Balsamo, P.J., Pereira, B.V.R., Hausen, M.A., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M., 2017. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. *Chemosphere* 186, 994-1005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.133>
- Dukas, R., Visscher, P.K., 1994. Lifetime learning by foraging honey bees. *Anim. Behav.* 48, 1007-1012. <https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1333>
- Ellis, J.D., Evans, J.D., Pettis, J., 2010. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. *J. Apic. Res.* 49, 134-136. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.30>
- Fernandes, K.M., Araújo, V.A., Serrão, J.E., Martins, G.F., Campos, L.A.O., Neves, C.A., 2010. Quantitative analyses of the digestive and regenerative cells of the midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera; Apidae). *Sociobiology* 56, 490-505.
- Fernandes, K.M., Martins, G.F., Serrão, J.E., Neves, C.A., 2012. Digestive and regenerative cells in the midgut of haploid and diploid males of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae). *Zoologia* 29, 488-492. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702012000500015>
- Ferreira, F.C., Cruz-Landim, C., 2004. Comparative study of the midgut morphology and digestive parameters in workers, queens and males of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae). *Naturalia* 29, 39-48.
- Fisher, A., Coleman, C., Hoffmann, C., Fritz, B., Rangel, J., 2017. The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (Hymenoptera: Apidae) forager survival. *J. Eco. Entomol.* 110, 802-808. <https://doi.org/10.1093/jee/tox031>
- Genersch, E., von der Ohe, W., Kaatz, H., Schroeder, A., Otten, C., Büchler, R., Berg, S., Ritter, W., Mühlen, W., Gisder, S., Meixner, M., Liebig, G., Rosenkranz, P., 2010. The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies. *Apidologie* 41, 332-352. <https://doi.org/10.1051/apido/2010014>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* 347: 1-16. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>

Gray, A., Brodschneider, R., Adjlane, N., Ballis, A., Brusbardis, V., Charrière, J.-D., Chlebo, R., Coffey, M.F., Cornelissen, B., Costa, C.A., Csáki, T., Dahle, B., Danihlík, J., Dražić, M.M., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Graaf, D., Gregorc, A., Johannesen, J., Kauko, L., Kristiansen, P., Martikkala, M., Martín-Hernández, R., Medina-Flores, C.A., Mutinelli, F., Patalano, S., Petrov, P., Raudmets, A., Ryzhikov, V.A., Simon-Delso, N., Stevanovic, J., Topolska, G., Uzunov, A., Vejsnaes, F., Williams, A., Zammit-Mangion, M., Soroker, V., 2019. Loss rates of honey bee colonies during winter 2017/18 in 36 countries participating in the COLOSS survey, including effects of forage sources. *J. Apic. Res.* 58, 479-485.

<https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1615661>

Gregorc, A., Alburaki, M., Rinderer, N., Sampson, B., Knight, P.R., Karim, S., Adamczyk, J., 2018. Effects of coumaphos and imidacloprid on honey bee (Hymenoptera: Apidae) lifespan and antioxidant gene regulations in laboratory experiments. *Sci. Rep.* 8, 1-13.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33348-4>

Grella, T.C., Soares-Lima, H.M., Malaspina, O., Nocelli, R.C.F., 2019. Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. *Chemosphere* 236, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.225>

Huang, Z.Y., Robinson, G.E. 1999. Social control of division of labor in honey bee colonies. In: Detrain C., Deneubourg, J.L., Pasteels, J.M. (Eds.), *Information Processing in Social Insects*. Birkhäuser, Basel, pp. 165-186.

Hung, K.-L.J., Kingston, J.M., Albrecht, M., Holway, D.A., Kohn, J.R., 2018. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. R. Soc. B* 285, 1-8.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2140>

Jaffe, B.D., Lois, A.N., Guédot, C., 2019. Effect of fungicide on pollen foraging by honeybees (Hymenoptera: Apidae) in cranberry differs by fungicide type. *J. Econ. Entomol.* 112, 499-503. <https://doi.org/10.1093/jee/toy353>

Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. *Técnicas básicas de citologia e histologia*, first ed. Editora Santos, São Paulo.

Kakamand, F.A.K.H., Mahmoud, T.T., Amin, A.-B.M., 2008. The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis mellifera* L. workers. *J. Dohuk. Univ.* 11, 144-151.

Khoury, D.S., Myerscough, M.R., Barron, A.B., 2011. A quantitative model of honey bee colony population dynamics. *PloS One* 6, 1-6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018491>

Kotthoff, U., Wappler, T., Engel, M.S., 2013. Greater past disparity and diversity hints at ancient migrations of European honey bee lineages into Africa and Asia. *J. Biogeogr.* 40, 1832-1838. <https://doi.org/10.1111/jbi.12151>

Kulhanek, K., Steinhauer, N., Rennich, K., Caron, D.M., Sagili, R.R., Pettis, J.S., Ellis, J.D., Wilson, M.E., Wilkes, J.T., Tarpy, D.R., Rose, R., Lee, K., Rangel, J., vanEngelsdorp, D., 2017. A national survey of managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *J. Apic. Res.* 56, 328-340. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1344496>

- Landim, C.C., Silva de Moraes, R.L.M., Serrão, J.E., 1996. Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult bee workers (Hymenoptera, Apidae). *J. Comp. Biol.* 1, 29-40.
- Lee, K.V., Steinhauer, N., Rennich, K., Wilson, M.E., Tarpy, D.R., Caron, D.M., Rose, R., Delaplane, K.S., Baylis, K., Lengerich, E.J., Pettis, J., Skinner, J.A., Wilkes, J.T., Sagili, R., vanEngelsdorp, D., 2015. A national survey of managed honey bee 2013-2014 annual colony losses in the USA. *Apidologie* 46, 292-305. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0356-z>
- Lehane, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 525-550. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>
- Malaspina O., Silva-Zacarin, E.C.M., 2006. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. *Braz. J. Morphol. Sci.* 23, 303-309.
- Malaspina, O., Stort, A.C., 1987. Sucrose syrup-collecting behavior in Africanized and Caucasian bees and in the descendants of their crossings. *Rev. Bras. Genét.* 10, 459-469.
- Mao, W., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2011. CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. Natl. Acad. Sci U S A* 108, 12657-12662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109535108>
- Mapa (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2020. <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/ap\\_ing\\_ativo\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_ingrediente\\_ativo=304](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_ing_ativo_detalhe_cons?p_id_ingrediente_ativo=304)>. Accessed in: april 3, 2020.
- Martins, G.F., Neves, C.A., Campos, L.A.O., Serrão, J.E., 2006. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. *Micron* 37:161-168. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.07.003>
- Mcmanus, J.F.A., 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature* 158, 202.
- Muli, E., Patch, H., Frazier, M., Frazier, J., Torto, B., Baumgarten, T., Kilonzo, J., Kimani, J.N., Mumoki, F., Masiga, D., Tumlinson, J., Grozinger, C., 2014. Evaluation of the distribution and impacts of parasites, pathogens, and pesticides on honey bee (*Apis mellifera*) populations in East Africa. *PloS One* 9, 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094459>
- Nicodemo, D., Mingatto, F.E., Carvalho, A., Bizerra, P.F.V., Tavares, M.A., Balieira, K.V.B., Bellini, W.C., 2018. Pyraclostrobin impairs energetic mitochondrial metabolism and productive performance of silkworm (Lepidoptera: Bombycidae) caterpillars. *J. Econ. Entomol.* 111, 1369-1375. <https://doi.org/10.1093/jee/toy060>
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 1998. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Honeybees, Acute Oral Toxicity Test nº213.
- Oliveira, C.R., Domingues, C.E.C., Melo, N.F.S., Roat, T.C., Malaspina, O., Jones-Costa, M., Silva-Zacarin, E.C.M., Fraceto, L.F., 2019. Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. *Chemosphere* 236, 1-12.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.013>

Oliveira, R.A, Roat, T.C., Carvalho, S.M., Malaspina, O., 2014. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Toxicol.* 29, 1122-1133. <https://doi.org/10.1002/tox.21842>

Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry, theoretical and applied: analytical technology*, fourth ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R., vanEngelsdorp, D., 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS One* 8, 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>

Pires, C.S.S., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., Pettis, J.S., Teixeira, E.W., 2016. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? *Pesq. Agropec. Bras.* 51, 422-442. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>

Potts, S.G., Roberts, S., Dean, R., Marris, G., Brown, M., Jones, R., Neumann, P., Settele, J., 2010. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *J. Apic. Res.* 49, 15-22. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.02>

Rand, E.E., Smit, S., Beukes, M., Apostolides, Z., Pirk, C.W.W., Nicolson, S.W., 2015. Detoxification mechanisms of honey bees (*Apis mellifera*) resulting in tolerance of dietary nicotine. *Sci. Rep.* 5, 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep11779>

Robinson, G.E., 1992. Regulation of division of labor in insect societies. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 637-665. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003225>

Rodriguez-Zas, S.L., Southey, B.R., Shemesh, Y., Rubin, E.B., Cohen, M., Robinson, G.E., Bloch, G., 2012. Microarray analysis of natural socially regulated plasticity in circadian rhythms of honey bees. *J. Biol. Rhythms* 27, 12-24. <https://doi.org/10.1177/0748730411431404>

Sáez, A., Aizen, M.A., Medici, S., Viel, M., Villalobos, E., Negri, P., 2020. Bees increase crop yield in an alleged pollinator-independent almond variety. *Sci. Rep.* 10, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59995-0>

Samarghandi, M.R., Mohammadi, M., Karami, A., Tabandeh, L., Dargahi, A., Amirian, F., 2017. Residue analysis of pesticides, herbicides, and fungicides in various water sources using gas chromatography-mass detection. *Pol. J. Environm. Stud.* 26, 2189-2195. <https://doi.org/10.15244/pjoes/70387>

Seeley, T.D., 1994. Honey bee foragers as sensory units of their colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34, 51-62.

Serrão, J.E., Cruz-Landim, C., 1996. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Cytobios* 88, 161-171.

Silva-Zacarin, E.C.M., Costa-Ferreira, R.A., Nocelli, R.C.F., Roat, T.C., Palma, M.S.,



Malaspina, O. 2011. Structure and function of the intestine and Malpighian tubules - from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. In: Stewart, E.M. (Org.), *Social Insects - Structure, Function, and Behavior*. Hauppauge, Nova Publishers, New York, pp. 121-142.

Silva-Zacarin, E.C.M., Chauzat, M.P., Zeggane, S., Drajnudel, P., Schurr, F., Faucon, J.P., Malaspina, O., Engler, J.A., 2012. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), *Current microscopy contributions to advances in science and technology*. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 696-703.

Snodgrass, R.E., 1956. *Anatomy of the honeybee*, first ed. Comstock Publishing, Ithaca.

Tadei, R., Domingues, C.E.C., Malaquias, J.B., Camilo, E.V., Malaspina, O., Silva-Zacarin, E.C.M., 2019. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. *Sci. Rep.* 9, 1-11.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>

Teixeira, E.W., Santos, L.G., Sattler, A., Message, D., Alves, M.L., Martins, M.F., Grassi-Sella, M.L., Francoy, T.M., 2013. *Nosema ceranae* has been present in Brazil for more than three decades infecting Africanized honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* 114, 250-254.  
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.09.002>

Terra, W.R., 2001. The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arc. Insect. Biochem. Physiol.* 47, 47-61. <https://doi.org/10.1002/arch.1036>

Terra, W.R., Ferreira, C., 2012. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilberte, L.I. (Ed.), *Insect molecular biology and biochemistry*. Academic Press, London, pp. 365-418.

Tosi, S., Nieh, J.C., 2019. Lethal and sublethal synergistic effects of a new systemic pesticide, flupyradifurone (Sivanto®), on honeybees. *Proc. Biol. Sci.* 286, 1-9.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0433>

Vannette, R.L., Mohamed, A., Johnson, B.R., 2015. Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. *Sci. Rep.* 5, 1-9. <https://doi.org/10.1038/srep16224>

von Frisch, K., Jander, R., 1957. Über die Schwänzeltanz der Bienen. *Z. Vgl. Physiol.* 40, 239-263. <https://doi.org/10.1007/BF00340570>

von Frisch, K., 1946. Die Tänze der Bienen. *Österr. Zool. Zh.* 1, 1-48.

Wood, T.J., Goulson, D., 2017. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 17285-17325.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>

Yoder, J.A., Jajack, A.J., Rosselot, A.E., Smith, T.J., Yerke, M.C., Sammataro, D., 2013. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field

study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. J. Toxicol. Environ. Health. Part A 76, 587-600. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.798846>

Zaluski, R., Justulin, L.A., Orsi, R.D.O., 2017. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). Sci. Rep. 7, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15581-5>

### 5 CAPÍTULO 3

A pesquisa referente a este capítulo foi conduzida no Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (câmpus de Rio Claro). O manuscrito foi publicado (dezembro 2020) na revista científica *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Fator de Impacto - 2019 = **4,872**) e está organizado conforme as normas da revista.

## **Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris***

Caio Eduardo da Costa Domingues<sup>a\*</sup>; Lais Vieira Bello Inoue<sup>a</sup>; Osmar Malaspina<sup>a</sup>; Elaine Cristina Mathias da Silva-Zacarin<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP) - “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências (IB), Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Rio Claro, SP, Brazil

<sup>b</sup>Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Departamento de Biologia (DBio), NuPECA (Núcleo de Pesquisa em Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas), Laboratório de Ecotoxicologia e Análise de Integridade Ambiental (LEIA), Sorocaba, SP, Brazil

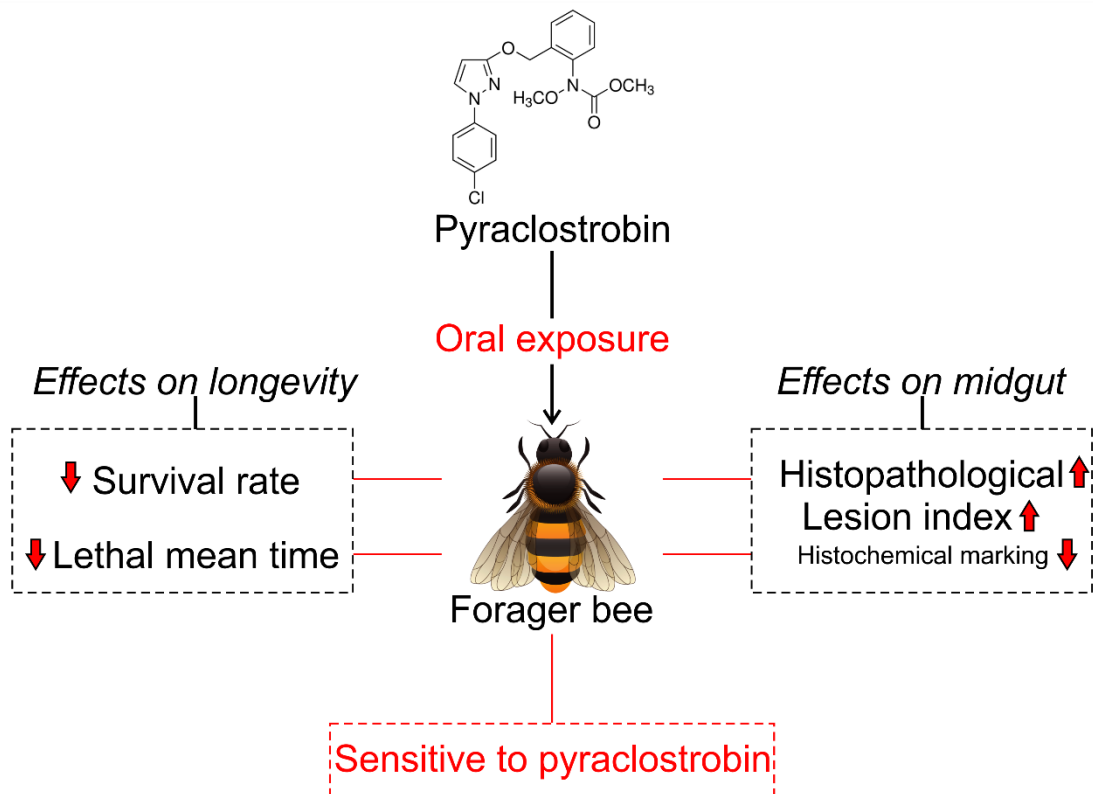
\***Corresponding to:** UNESP - CEIS, Avenida 24 A, nº 1515, Jardim Bela Vista, 13.506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

**E-mail address:** [cecdomingues@gmail.com](mailto:cecdomingues@gmail.com) (C.E. da Costa Domingues)

### **HIGHLIGHTS**

- Pyraclostrobin is cytotoxic for the Brazilian stingless bee *Melipona scutellaris*
- Longevity and median lethal time were reduced in foragers after fungicide exposure.
- Sublethal concentrations of pyraclostrobin damaged the midgut morphophysiology
- Fungicide decreased marking intensity of polysaccharides and proteins in midgut
- Individual fitness performance was severely impaired by the pyraclostrobin

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ABSTRACT

Native stingless bees are key pollinators of native flora and important for many crops. However, the loss of natural fragments and exposure to pesticides can hinder the development of colonies and represent a high risk for them. Nevertheless, most studies are conducted with honeybees and there are not many studies on native species, especially in relation to the effects of fungicides on them. Therefore, the objective of this paper is to evaluate the effects of sublethal concentrations of pyraclostrobin, on *Melipona scutellaris* forager workers. These Brazilian native stingless bees were submitted to continuous oral exposure to three concentrations of pyraclostrobin in sirup: 0.125 ng a.i./ $\mu\text{L}$  (P1), 0.025 ng a.i./ $\mu\text{L}$  (P2), and 0.005 ng a.i./ $\mu\text{L}$  (P3). Histopathological and histochemical parameters of midgut, as well as survival rate were evaluated. All concentrations of fungicide showed an increase in the midgut lesion index and morphological signs of cell death, such as cytoplasmic vacuolizations, presence of atypical nuclei or pyknotic nuclei. Histochemical analyzes revealed a decreased marking of polysaccharides and neutral glycoconjugates both in the villi and in peritrophic membrane in all exposed-groups in relation to control-groups. P1 and P2 groups presented a reduction in total protein marking in digestive cells in relation to control groups. As a consequence of alteration in the midgut, all groups exposed to fungicide showed a reduced survival rate. These findings demonstrate that sublethal concentrations of pyraclostrobin can lead to significant adverse effects in stingless bees. These effects on social native bees indicate the need for reassessment of the safety of fungicides to bees.

**Keywords:** Ecotoxicology; Midgut; Meliponini; Pyraclostrobin; Sublethal effects.

## 1. Introduction

Bees are pollinating insects of the order Hymenoptera with a wide diversity on a global scale, including at least 20,000 described species (Michener, 2007). According to Silveira et al. (2002), because of the large variety of biomes and habitats, Brazil has more than 3000 species of bees. Amongst them, there are 244 valid species of native fauna stingless bees (Apidae: Meliponini) (Pedro, 2014).

Amidst such great diversity of native stingless bee species in Brazil, the Meliponini tribe covers 60 genera distributed in tropical and subtropical regions (Michener, 2007). These bees can pollinate 30–90% of the native flora, promoting ecological diversity through genetic variability and helping maintain ecosystems (Bruckman and Campbell, 2014; Kerr, 1997). Stingless bees can also effectively pollinate economically important crops (Ramirez et al., 2018; Slaa et al., 2006), as well as hot pepper (Putra et al., 2014), tomatoes (Santos et al., 2009), strawberry (Malagodi-Braga and Kleinert, 2004), coffee (Klein et al., 2003), coconut, mango, avocado, pepper, pitanga, and others (Heard, 1999; Silva et al., 2014), increasing fruiting and fruit quality.

Stingless bees of the Meliponini tribe, *Melipona scutellaris* Latreille 1811 (Hymenoptera: Apidae), are native to the northeast region of Brazil (Alves et al., 2012). However, bees of this species are present in other regions of the country, since they were introduced in the southeast region and are easily managed for the production and commercialization of honey, propolis, and pollen (Nogueira-Neto, 1997).

Although *M. scutellaris* holds economic importance and relevance related to the pollination of native plants (Imperatriz-Fonseca et al., 2007), just like honeybees, they are exposed to a wide range of stressors on field, such as pesticides, which are largely used on crops in Brazil (Pires et al., 2016) and worldwide. The loss of natural habitats is also alarming, especially when it comes to stingless bees, which depend on forest fragments for

nesting and as sources of floral resources. Thus, the maintenance of Atlantic Forest fragments as a strategy to help preserve stingless bees is imperative, as evidenced by Arena et al. (2018).

Currently, ecotoxicological studies are focused on *Apis mellifera*. Honeybees is used as a surrogate for non-*Apis* bee species in many countries in order to evaluate the risk of pesticides to all bee species (Cham et al., 2019). But it is necessary to evaluate the risk assessment for pesticides in native bees because there is uncertainty about the use of honeybee as surrogate for bees in general (Boyle et al., 2019). In addition, some native species, including *M. scutellaris*, are listed in the Brazil Red Book of Threatened Species of Fauna (ICMBio, 2018; Lima et al., 2016).

Studies have demonstrated the sensitivity of *M. scutellaris* in relation to anthropogenic impacts on landscapes (Brosi, 2009; Brown and Oliveira, 2014) and harmful effects of insecticides, which have been observed in larvae (Dorigo et al., 2019) and forager workers (Arena and Sgolastra, 2014; Costa et al., 2015; Lourenço et al., 2012a, 2012b; Morais et al., 2018). However, studies using other pesticides, such as herbicides (Nocelli et al., 2019) and specifically fungicides (Prado et al., 2020) are rare.

Fungicides have been widely used in agriculture and forager bees can be exposed to aerial spraying during their flight or by collection floral resources containing residues, which have already been found in nectar and pollen (Chauzat et al., 2006; Kubik et al., 1999; Mullin et al., 2010; Pettis et al., 2013; Tong et al., 2018). In Brazil, 546 commercial fungicides are currently registered, divided into more than 50 chemical groups (Mapa, 2020).

Pyraclostrobin is a strobilurin fungicide whose mechanism of action is the inhibition of mitochondrial respiration, by means of binding to the Qo site of cytochrome b, thereby interrupting fungi energy production (Bartlett et al., 2002). This fungicide is applied on leaves, thatch, furrows, and seeds in many crops (Mapa, 2020). Although pyraclostrobin acts on disease-inducing fungi, the use of this fungicide has already led to adverse effects in not-



target organisms, such as honeybee larvae and adults (Batista et al., 2020; Tadei et al., 2019; Zaluski et al., 2017). Campbell et al. (2016) observed that exposure to Pristine® can affect flight muscles mitochondria of honeybees' and it is reasonable to believe that the consumption of this fungicide affects the intestine.

The insect intestine is divided into three regions, defined as the anterior intestine (food ingestion and storage), middle intestine (nutrient digestion and absorption), and posterior intestine (reabsorption and excretion) (Cruz-Landim and Rodrigues, 1967; Silva-Zacarin et al., 2011). As the intestine is in charge of such relevant functions, this organ is widely used in ecotoxicological studies with bees that have been orally exposure to pesticides (Batista et al., 2020; Carneiro et al., 2020; Castro et al., 2020; Catae et al., 2014; Lopes et al., 2018; Oliveira et al., 2014). Residual pesticides molecules in ingested food can be absorbed in the middle intestine. The midgut consists of three cell types: digestive cells, responsible for digestion, absorption, and synthesis of the peritrophic membrane components; regenerative cells, organized in nests at the base of the intestinal epithelium and responsible for cell renewal; endocrine cells, responsible for the production of hormones (Caccia et al., 2019; Silva-Zacarin et al., 2011).

The present study intends to fill the gaps in the understanding of adverse effects of fungicides on stingless bees. In this perspective, considering that stingless bees forage on crops or their surroundings, they are potentially exposed to fungicides and they can be harmed by them. Thus, the objective of the present work was to evaluate the effects of sublethal concentrations of fungicide pyraclostrobin on the midgut of forager workers of *M. scutellaris*, based on the evaluation of histopathological and histochemical parameters, as well as survival rate.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Collection of stingless bees and toxicological bioassays

Foragers of *M. scutellaris* from six different colonies were collected at the meliponary of Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro campus (22°23' 48.851" S; 47° 32'38.234" W). Collection was performed using beecages (250 mL, 9 cm x 7 cm) containing feeders with sucrose solution (50% sugar and 50% water, wt/wt), directly at the entrance of the colonies. After collection, forager bees were placed in an incubator at  $28 \pm 1$  °C and relative humidity of  $70\% \pm 5\%$  for 2 h, under dark conditions, before the bioassay started.

Bees were fed *ad libitum* with pyraclostrobin (Sigma-Aldrich, analytical standard, CAS Number 175013-18-0, 99.9% purity) at concentrations of 0.125 ng a.i./ $\mu$ L (P1), 0.025 ng a.i./ $\mu$ L (P2), and 0.005 ng a.i./ $\mu$ L (P3) in a 50% sucrose solution, for 5 days. Choices of concentrations were based on studies that found pyraclostrobin residues in pollen and beebread (Pettis et al., 2013; Yoder et al., 2013), and on the sublethal concentrations already used in laboratory bioassays involving the oral exposure of honeybees (Tadei et al., 2019; Zaluski et al., 2017). Control bees (CL) were fed a no-fungicide sucrose solution. The acetone solvent control (AC) received a sucrose solution containing acetone, which did not exceed 1% of the final volume, in groups P1, P2, and P3, as recommended by OECD (1998). An AC group (solvent control) was added because pyraclostrobin has a property that makes it not completely soluble in water.

Each experimental group contained 80 bees ( $n = 20$ , in four replicates) that were fed *ad libitum* throughout the bioassay (5 days). Three bioassays were carried out using six different colonies, totaling 1200 bees used in the present study to ensure data replicability and reliability.

## 2.2. Processing of organs for light microscopy

Twelve foragers from each experimental group were collected after a period of 5 days of exposure, anesthetized under refrigeration (4° C) for 1 minute and dissected under a stereomicroscope (Leica EZ4 HD) at room temperature, using the phosphate buffered saline solution (0.1 mol) L<sup>-1</sup>, pH 7.4. The midgut of each bee was immersed in a fixative solution (paraformaldehyde 4% in phosphate buffered saline, 0.1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7.4) for 24 h. Then, the organs were dehydrated in a battery with an increasing concentration of ethanol as described by Silva-Zacarin et al. (2012) and embedded in the Historesin Embedding Kit (Leica), following the owner's manual instruction. Non-sequential 6 µm histological sections of the midgut were obtained in a microtome (Leica RM 2255) and stained with hematoxylin and eosin following the protocol established by Junqueira and Junqueira (1983). Morphological patterns of each experimental group (histopathological analysis) were established through 200 micrographs of the midgut, documented per group, and analyzed using light photomicroscope (Olympus BX51) with DP controller software for image acquisition.

## 2.3. Midgut histopathological analysis: Lesion index determination

Semi-quantitative histopathological analyses of the potential changes caused by pyraclostrobin concentrations in the midgut were based on protocols designed by Oliveira et al. (2019) and by Grella et al. (2019) for *A. mellifera*, *M. scutellaris*, and *Scaptotrigona postica* bees, respectively. Analysis parameters used to assess organ damage index were adapted from Bernet et al. (1999), where the calculation to determine all histological changes is based on the importance factor and on the score value, which are classified as unchanged (0), slight occurrence (1), moderate occurrence (2), and severe occurrence (3). In the present study, the importance factors analyzed were based on the pathological relevance of specific parameters in the bees' midgut, such as apocrine secretion, cells eliminated into lumen,

spherocrystals (importance factor 1), cell vacuolization, atypical nuclei (importance factor 2), pyknotic nuclei, and damage in regenerative cell nests (importance factor 3).

The parameters described were quantified using 200 micrographs of the midgut, obtained from 10 slides per each experimental group.

#### *2.4. Histochemical marking intensity on the midgut*

Slides containing histological sections of the medium intestine of forager bees were also subjected to periodic acid-Schiff histochemical technique (McManus, 1946, 1948) for marking neutral polysaccharides and glycoconjugates present in the villi and in the peritrophic membrane, and bromophenol blue (Junqueira and Junqueira, 1983) was used to mark total proteins present in the organic constituents of spherocrystals in digestive cells. Thirty images from each experimental group were used and the quantification of the marking intensity was performed applying the ImageJ software, through the particle determination analysis.

#### *2.5. Survival analysis and lethal mean time*

Survival time and median lethal time of forager bees in all groups were calculated through a fourth bioassay (additional) ( $n = 80$  bees per experimental group). Bees were daily exposed to the fungicide. Mortality was recorded until the last bee died. CL and AC groups were added to the bioassay and were fed their respective diets for the same period.

#### *2.6. Statistical analysis*

At first, midgut data were submitted to test for normal distribution (Shapiro–Wilk test and Kolmogorov–Smirnov test) and Bartlett’s test for homogeneity of variances. After this preliminary verification, histopathological midgut data for lesion index determination and histochemical marking intensity were submitted to the Kruskal–Wallis non-parametric test

followed by the Dunn's post-test for multiple comparisons using the GraphPad Prism Version 8.4.3 (686) statistical software (GraphPad Prism Software, Inc). Results were represented with mean  $\pm$  standard error and significance level of  $p < 0.05$ .

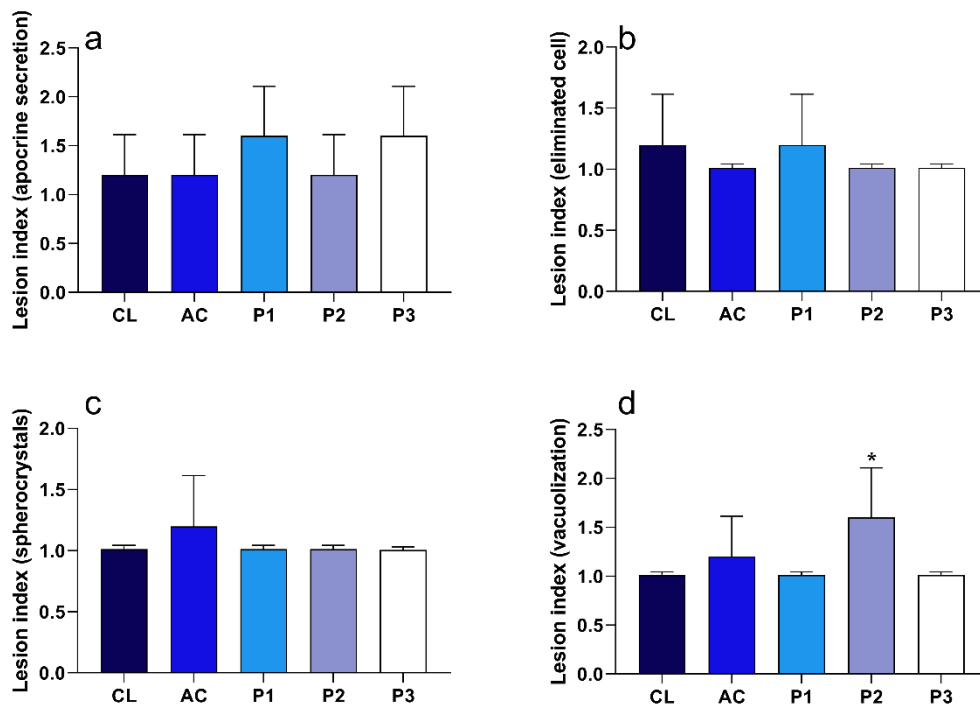
Survival analysis was performed using Cox's regression model and the "survival" package (Therneau, 2015; Therneau and Grambsch, 2000). The "ecotox" package was used to analyze the average lethal time (Hlina et al., 2018). All results were analyzed using the R program (version 3.6.1; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, AT, 2019).

### 3. Results

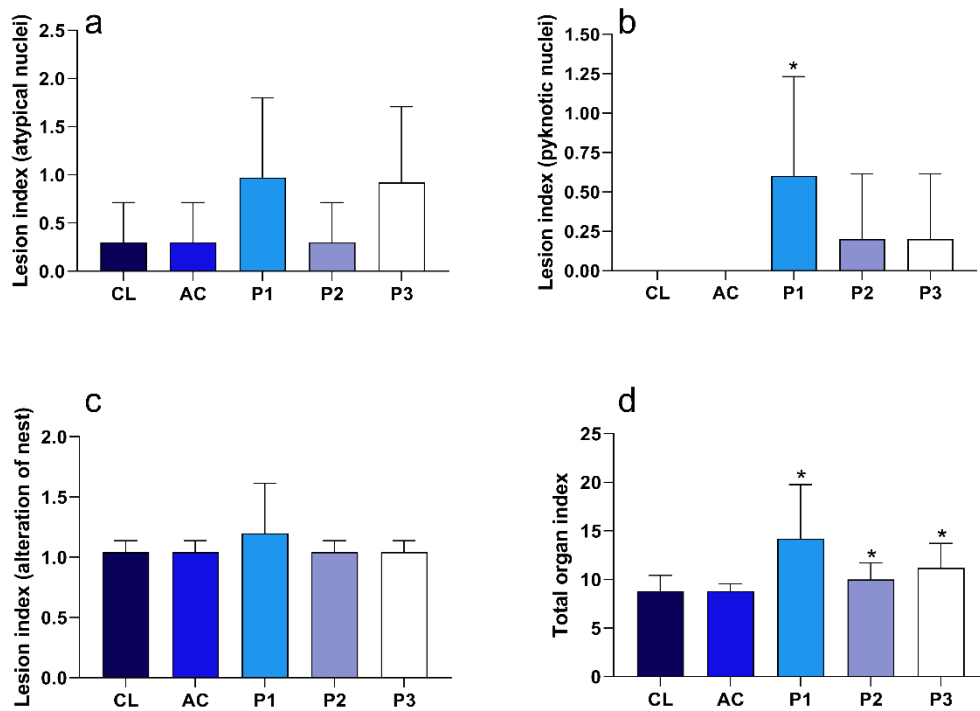
#### 3.1. Lesion indexes and organ index

Lesions indexes of the different parameters analyzed in the midgut of *M. scutellaris* foragers, after 5 days of oral exposure to pyraclostrobin, are shown in Fig. 1 and Fig. 2a–c. There was no statistical difference ( $p > 0.05$ ) among the experimental groups for the lesion indexes corresponding to the following parameters: apocrine secretion (Fig. 1a), eliminated cell (Fig. 1b), spherocrystals (Fig. 1c), atypical nuclei (Fig. 2a) and the alteration of nest (Fig. 2c). However, for the lesion index corresponding to the vacuolization parameter (Fig. 1d), a statistical difference ( $p < 0.05$ ) was found for the P2 group in relation to all other experimental groups. A statistical difference ( $p < 0.05$ ) of P1 was found for the lesion index corresponding to the pyknotic nuclei parameter (Fig. 2b) when compared to the CL and AC groups.

The organ's total index, which takes into account the sum of all quantified parameters, showed a statistical difference ( $p < 0.05$ ) in groups P1 ( $14.2 \pm 6.8$ ), P2 ( $10 \pm 1.9$ ), and P3 ( $11.2 \pm 2.8$ ) in relation to CL ( $8.8 \pm 1.8$ ) and AC ( $8.8 \pm 0.8$ ), as shown in the figure 2d. Control bees (CL and AC) midgut showed no tissue damage.



**Fig. 1.** Lesions indexes in the midguts of foragers stingless bees (*M. scutellaris*). (a) Apocrine secretion index; (b) eliminated cell index; (c) spherocrystals index; (d) vacuolization index. Asterisk in d indicate statistical difference ( $p < 0.05$ ).

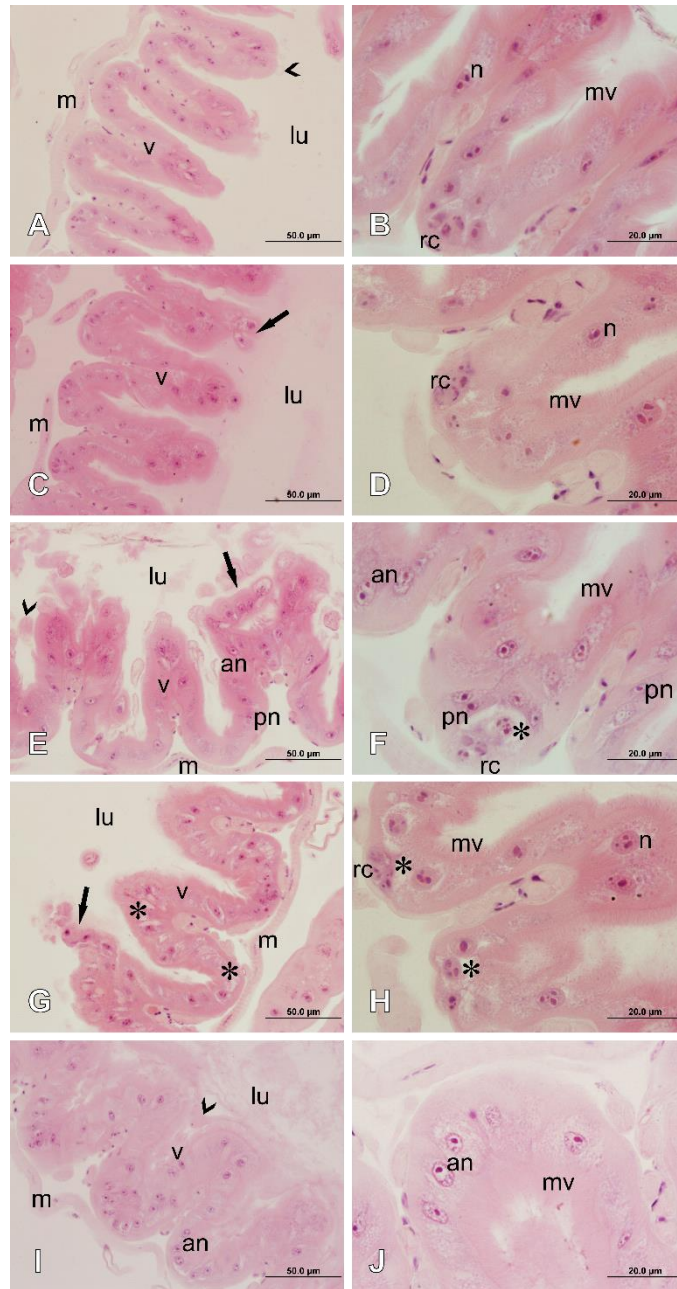


**Fig. 2.** Lesions indexes and total organ index in the midguts of foragers stingless bees (*M. scutellaris*) midguts. (a) Atypical nuclei index; (b) pyknotic nuclei index; (c) Alteration of nest index; (d) total organ index. Asterisk in b and d indicate statistical difference ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Morphological analysis and histochemical quantification

The morphological analyzes of the midgut of *M. scutellaris* foragers showed that the CL and AC groups presented the same morphological pattern of the intestinal villi (Fig. 3A–D), with visceral muscle fibers, constituted by a simple epithelium of prismatic cells with elliptical nuclei or spherical and brush border clearly evident in the apical portion of the cells, with regenerative cell nests at the base of the epithelium surrounded by digestive cells (Fig. 3B, D).

However, the intestines of foragers in groups P1, P2, and P3 showed changes in the normal histological patterns observed in the control groups CL and AC (Fig. 3E–J). The villi of group P1 were irregular with elimination of cells in blocks and apocrine secretion releasing to the lumen (Fig. 3E), digestive cells with atypical nuclei with chromatin condensation, and a clear halo around them, presence of pyknotic nuclei and vacuolization in the basal region where regenerative cell nests are present (Fig. 3F). In group P2, intense cytoplasmic vacuolization was observed in digestive cells (Fig. 3G) and at the base of the epithelium (Fig. 3H), and elimination of cells in blocks from the lumen (Fig. 3G). Regarding the P3 group, the presence of digestive cells with atypical nuclei was observed (Fig. 3I, J), similar to those found in P1.

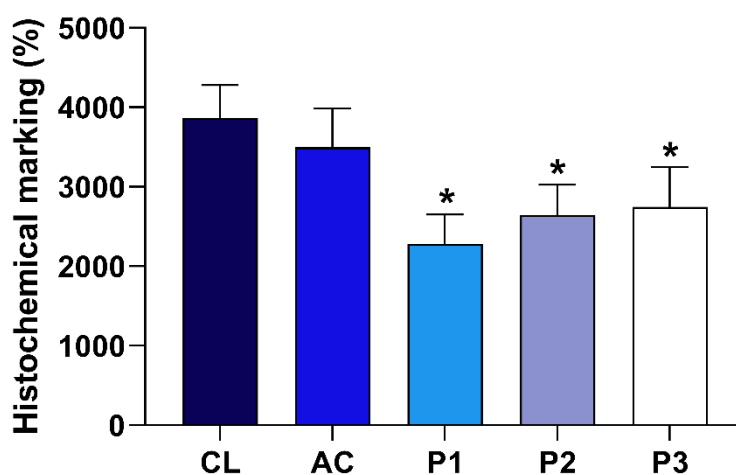


**Fig. 3.** Midgut of *M. scutellaris* foragers. Sections stained with hematoxylin and eosin. (A, B) CL group (control), (C, D) AC group (solvent control), (E, F) P1 group (0.125 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin), (G, H) P2 group (0.025 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin), (I, J) P3 group (0.005 ng a.i./ $\mu$ L of pyraclostrobin). an = atypical nuclei, black arrow = cell elimination, head arrow = release of apocrine secretion, lu = lumen, m = muscle, mv = microvilli, n = nuclei, pn = pyknotic nuclei, rc = regenerative cells, v = villi, \* = vacuolization. A, C, E, G, I = Villi overview. B, D, F, H, J = Detailed view of villi.

Regarding the quantification of histochemical markings intensities, both techniques demonstrated statistical differences between the groups exposed to pyraclostrobin in comparison to the control groups, as illustrated in Figs. 4 and 5. The reaction to periodic acid-Schiff revealed a decrease in the positive marking for neutral polysaccharides and

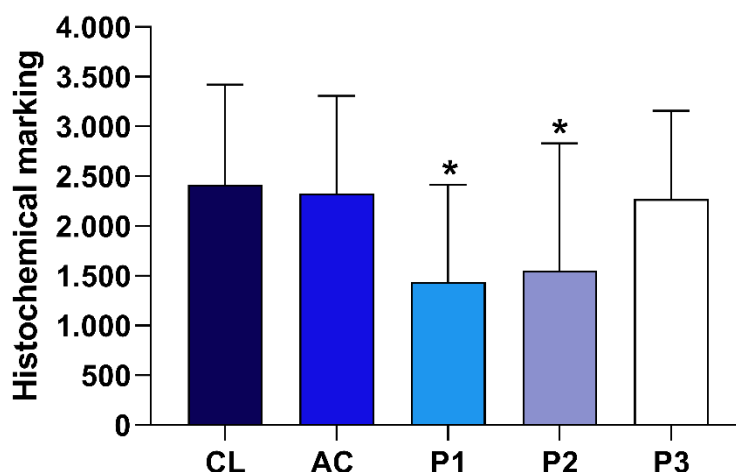


glycoconjugates in the concentrations of pyraclostrobin, showing a statistical difference ( $p < 0.05$ ) in groups P1 (mean = 2282.41), P2 (mean = 2643.52), and P3 (mean = 2748.29) in relation to the CL (mean = 3869.08) and AC (mean = 3495.9) groups, as shown in Fig. 4. However, when compared to each other (P1, P2, and P3), no statistical differences were observed in relation to the decrease in positive marking ( $p > 0.05$ ).



**Fig. 4.** Intensity of the positive marking for the periodic acid-Schiff histochemical reaction in the *M. scutellaris* midgut after pyraclostrobin fungicide exposure. The reduction in the % of labeling of polysaccharides and neutral glycoconjugates can be observed in groups P1, P2 and P3. Asterisks indicate statistical difference ( $p < 0.05$ ) to the CL and AC groups.

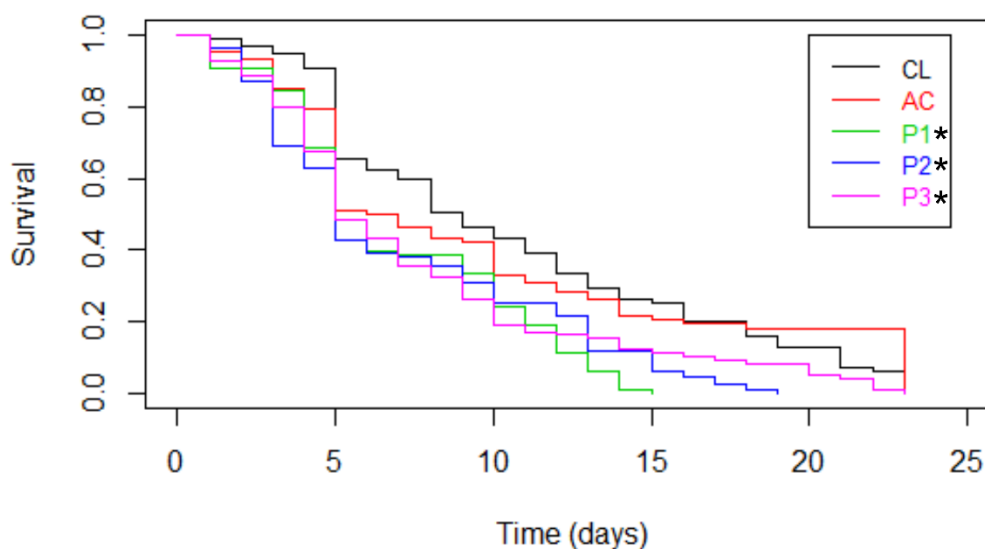
The bromophenol blue reaction allowed for the observation of a reduction in the positive staining for total proteins in the P1 (mean = 1438.06) and P2 (mean = 1551.88) groups, with statistical difference ( $p < 0.05$ ), in relation to the P3 group (mean = 2272.94), CL (mean = 2415.56), and AC (mean = 2328.44) (Fig. 5).



**Fig. 5.** Intensity of the positive marking for the bromophenol blue histochemical technique in the *M. scutellaris* midgut after exposure to the pyraclostrobin fungicide. The reduction in the % of total protein labeling can be observed in groups P1 and P2. Asterisks indicate statistical difference ( $p < 0.05$ ) to the CL and AC groups.

### 3.3. Survival pattern and median lethal time

The concentrations of pyraclostrobin showed interference in the bees' survival time upon continuous oral exposure, resulting in a decrease in the longevity of groups P1, P2, and P3 compared to groups CL and AC (Fig. 6), with statistical differences verified by Cox regression analysis model (survival package) ( $p < 0.01$ ). The survival bioassay lasted 23 days and the results showed that the P1 group bees had their lifetime reduced by 37.5% when compared to CL, and 26.4% when compared to AC. In relation to P2, a 37.8% lifetime reduction was observed with regards to CL and 26.8% with regards to AC. P3 presented a 36.1% lifetime reduction when we observed CL, and 24.8% when compared to AC. Based on Fig. 6, it is still possible to observe intensified decay for bees from groups P1, P2, and P3 on the 5th day of the survival bioassay. The curve for these groups decayed completely before the complete decay of the control groups (CL and AC).



**Fig. 6.** *M. scutellaris* survival pattern after exposure to pyraclostrobin. Cox regression model and the “survival” package (R, version 3.6.1). Asterisks indicate statistical differences ( $p < 0.01$ ) to the CL and AC groups.  $n = 80$  bees per experimental group.

The median lethal time (MLT) of groups P1 ( $6.15 \pm 0.56$  days), P2 ( $6.12 \pm 0.68$  days), and P3 ( $6.29 \pm 0.85$  days) were statistically lower than the MLT of CL ( $9.84 \pm 0.92$  days) and AC ( $8.36 \pm 1.44$  days) with a 95% confidence interval ( $p < 0.05$ ) (Table 1). However, the MLT of pyraclostrobin concentrations were statistically similar ( $p > 0.05$ ) (Table 1).

**Table 1**

Effects of oral exposure to pyraclostrobin in the MLT, in days, of foragers workers of *M. scutellaris*.

Groups	Time	LCL	UCL	MLT	Chi-square	Difference
CL	9.87	8.93	10.76	9.84	75.88	a
AC	8.47	6.93	9.80	8.36	104.85	ab
P1	6.17	5.59	6.70	6.15	50.47	c
P2	6.15	5.45	6.80	6.12	44.54	c
P3	6.34	5.44	7.14	6.29	64.58	bc

Legend - LCL - lower confidence limit, UCL - upper confidence limit, MLT - median lethal time. “ecotox” package for analyzing the median lethal time (R, version 3.6.1). Confidence interval with 95% probability. Different letters represent statistically differences ( $p < 0.05$ ) and equal letters indicate no significant difference ( $p > 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The results of present study from multi-bioindexes analysis reinforced the hypothesis that orally ingested pyraclostrobin is cytotoxic for midgut, as diagnosed by the histopathological and histochemical parameters, leading to a reduced survival rate in all fungicide exposed-groups.

In recently previous studies, the adverse effects of fungicide pyraclostrobin have been described in non-target organisms, such as honeybees (Batista et al., 2020; Degrandi-Hoffman et al., 2015; Nicodemo et al., 2020; Tadei et al., 2019), *Bufo cognatus* (Hooser et al., 2012), *Hyalella azteca* (Willming and Maul, 2016), *Lymnaea stagnalis* (Fidder et al., 2016), *Danio rerio* (Zhang et al., 2017), and *Eisenia fetida* (Ma et al., 2019). In consonance with these studies, in this present work was demonstrate that *M. scutellaris* native stingless bee were sensitive to all parameters analyzed after exposure to pyraclostrobin, which is alarming since the estimated intake (ng/bee) during the 5-day bioassay is similar to the concentrations that can be found in floral resources collected by foragers (Pettis et al., 2013; Yoder et al., 2013) and stored in the colony as food supply for their individuals.

The relation between a decrease longevity among forager workers subjected to oral fungicide exposure may bear a potential close relation with the histopathological and histochemical changes observed in the midgut of bees in exposed groups, due to the vital functions performed by the midgut to maintain individual-level homeostasis. The midgut is an alimentary canal region of endodermal origin found in bees, responsible for most of the digestion and absorption of nutrients (Snodgrass, 1956; Terra and Ferreira, 2012). Although this structure is characteristic of insects, in a comparative study on the feeding channel involving 15 species of social bees, Cruz-Landim and Rodrigues (1967) demonstrated structural differences in histology and mainly in anatomy in the anterior, medium and posterior intestines of the examined species. According to Ferreira and Cruz-Landim (2004),

there are differences in the length of the midgut among individuals in the same colony. In this sense, studies that contemplate other species of bees, such as native ones, and not only exotic bees, such as Africanized *A. mellifera* (Batista et al., 2020; Carneiro et al., 2020; Domingues et al., 2017; Johnson et al., 2013; Leite et al., 2018; Zaluski et al., 2017), are crucial. Such relevance is justified because, given the intestinal tissue particularities in these species (Cruz-Landim and Rodrigues, 1967), they provide important ecosystem services to the environment (Kerr, 1997; Kremen et al., 2002), and are exposed to different environmental stressors (Cham et al., 2019; Goulson et al., 2015). Furthermore, the number of studies is still quite limited when compared to studies on honeybees.

Lesion index is an important assessment tool, with applicability in different organs. It monitors histopathological changes caused by xenobiotics and was first standardized for fish (Bernet et al., 1999) and later adapted for bees (Grella et al., 2019; Oliveira et al., 2019; Tadei et al., 2020). The total lesion index of *M. scutellaris* midgut demonstrated that the three fungicide concentrations resulted in morphological changes, that is, even the lowest field concentration ingested continuously for 5 days is already capable of inducing tissue damage in the intestine. Physiological vital functions of the individuals were not properly performed, once such exposure reduces the longevity of those individuals exposed to the three fungicide concentrations. Carneiro et al. (2020) showed that oral exposure to LD50 of fungicide iprodione caused lesions in the midgut of newly emerged *A. mellifera* workers at 12 h and 24 h. In addition, such index increased over time, corroborating with the data of the present study, in which much lower concentrations than the LD50 > 73.1 µg of pyraclostrobin/bee were ingested. An increase in the midgut lesion index was also observed in foragers of *A. mellifera* exposed to pyraclostrobin (Domingues et al., 2020).

Thus, according to Grella et al. (2019) the morphological damage caused by pesticides in the intestine can compromise not only the individual fitness, but that of the whole colony.

Nevertheless, a study by Nicodemo et al. (2020), demonstrated that pyraclostrobin interfered in the mitochondrial activity of forager *A. mellifera* workers, which compromises the energy demand destined for foraging and consequently collection and entry of resources into the colony

Midgut morphological changes observed here, just like the irregular villi histoarchitecture, cytoplasmic vacuolizations, presence of atypical nuclei, pyknotic nuclei in digestive cells, and chromatin condensation, are indicative of pyraclostrobin cytotoxicity in all tested concentrations. Previous studies, after exposure of *A. mellifera* to different fungicides, described morphological (Batista et al., 2020; Carneiro et al., 2020) and physiological changes (Degrandi-Hoffman et al., 2015; Mao et al., 2017) in the midgut. Based on these results, the observed sublethal effects of pyraclostrobin may be interfering with the detoxification mechanisms of intestinal cells (Diao et al., 2005; Mao et al., 2017), and may be leading to morphological characteristics indicative of cell death by apoptosis (Elmore, 2007; Kerr et al., 1972).

According to Cavalcanti and Cruz-Landim (2004) the main cells involved in the process of cell death exhibit compact central nuclei with condensed chromatin and a clear halo around them, exactly as observed in the cells of the groups exposed to pyraclostrobin in the present study. Kerr et al. (1972) described that the pyknotic nuclei are easily visible in light microscopy and indicate cell death, and the authors considered it to be apoptosis. Our results demonstrated that this characteristic was observed in the main cells exposed to pyraclostrobin (P1, P2, and P3). Such features related to programmed cell death were also described by Silva-Zacarin (2007) in the salivary glands of honeybee larvae that presented cells with cytoplasm vacuolization, chromatin compaction, and perichromatin halo, which indicates that these morphological characteristics are common during cell death in insect

tissues. Batista et al. (2020) described these same morphological characteristics for the midgut of newly emerged Africanized *A. mellifera* workers exposed to the fungicide picoxystrobin.

A disturbance in the midgut homeostasis was reflected in the low marking intensity for neutral polysaccharides-glycoconjugates and proteins present in histochemical analyzes. The midgut is covered by a matrix that separates the lumen and intestinal villi into two compartments (endoperitrophic and ectoperitrophic), called peritrophic membrane (PM) (Terra, 2001), which in the present study was detected by the positive periodic acid-Schiff marking due to its large amount of neutral polysaccharides-glycoconjugates. PM functions in bees include the protection of digestive cells, control of substances flow, permeability, and initial digestion by enzymes are described (Terra, 2001). According to Brandt et al. (1978), PM can act as a physical barrier against parasites and bacteria. Digestive cells are responsible for the synthesis of the components of the peritrophic membrane (Smith, 1968). Thus, periodic acid-Schiff marking reduction in the midgut of P1, P2, and P3 is totally related to the adverse effect caused by pyraclostrobin and, consequently, the synthesis and secretion of these components may be compromised.

Regarding the protein marking by bromophenol blue, the reduction observed in P1 and P2 suggests the loss of another important physiological function of the organ. Digestive cells have excretory capacity and inclusions in their cytoplasm, which are positive for bromophenol blue. They appear as spherocrystals that can act in the cell osmoregulation and storage/neutralization of potentially toxic metabolites for their subsequent excretion (Cruz-Landim and Serrão, 1997; Serrão et al., 2008). Spherocrystals reduction, positive to bromophenol blue, can occur as insect age, which was observed by Ryerse (1979) in *Calpodex ethlius*. However, in the present work it was possible to verify that pyraclostrobin was responsible for the reduction of the amount of spherocrystals, which could be a reflex of

cellular metabolism impairment and excretion of toxic products in this metabolism, as a response to fungicide exposure.

The reduction in foragers longevity in the face of continuous exposure to sublethal concentrations of pyraclostrobin in groups P1, P2, and P3, as a consequence of morphological and histochemical lesions, corroborate with previous studies that also demonstrated a reduction in longevity in *A. mellifera* foragers exposed to fungicides (Domingues et al., 2017; Fisher et al., 2017). Tadei et al. (2019) showed that oral exposure to low doses of pyraclostrobin in the larval stage of *A. mellifera* reduced the longevity of young bees, demonstrating the late effect of the fungicide in their development.

However, this longevity reduction scenario related to *M. scutellaris* foragers can lead to impacts in the colony, which is alarming. In view of the fact that the maximum number of individuals in the colony does not exceed seven thousand, considering that adult workers take 40 days to fully develop (Alves et al., 2009) and that their life expectancy of around 31 days (Alves et al., 2009; Oliveira and Kleinert-Giovannini, 1991), we suggest that the rate of dead workers replacement is slow. Consequently, the mortality of *M. scutellaris* foragers could result in the colony collapse due to the endangerment of resource input, workers replacement, brood thermoregulation, and impaired ability to fight kleptoparasites, such as phorids.

Thus, when compared to honeybees, we can confirm native bees face an increased risk, since the Africanized *A. mellifera* workers takes 18–19 days to develop (Winston, 1992) with a life expectancy of around 50–75 days (Page and Peng, 2001). Population-wise, a honeybee colony can reach up to one hundred thousand individuals, which represents a much faster replacement rate than that of *M. scutellaris*.

This hypothesis is corroborated by Dorigo et al. (2019), who demonstrated that *M. scutellaris* larvae are 320 times more sensitive to dimethoate (standard insecticide in toxicological tests) when compared to Africanized *A. mellifera* larvae. Previous studies have



also shown that stingless bees are more sensitive to pesticides than bumblebees (Arena and Sgolastra, 2014) and honeybees (Tomé et al., 2017). These findings are also corroborated by Brown and Albrecht (2001) with bees of the genus *Melipona*, which demonstrated that bees of this genus are sensitive to anthropogenic disorders, such as habitat fragmentation, and can be used as indicators of changes in the landscape.

In this perspective, the present research highlights the importance of studies focusing on the effects of fungicides on native species of bees and underscores the need to determine and consider their sensitivity in risk assessment monitoring programs related to pesticides.

## 5. Conclusion

The results found by the present work, on the oral exposure of *M. scutellaris* foragers to sublethal concentrations of fungicide pyraclostrobin, showed significant adverse effects on the midgut morphophysiology and, consequently, a reduction in the bees' time of survival. These findings demonstrate that fungicide pyraclostrobin can lead to significant deleterious effects in stingless bees at a colonial level, thus stressing the need for future re-evaluation of the safety of fungicides to bees.

## CRediT authorship contribution statement

**Caio Eduardo da Costa Domingues:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration. **Lais Vieira Bello Inoue:** Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing - review & editing. **Elaine Cristina Mathias da Silva-Zacarin:** Conceptualization, Resources, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition. **Osmar Malaspina:** Conceptualization, Resources, Supervision, Writing - review & editing, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgments

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant numbers 2016/15743-7, 2017/21097-3). We would like to thank laboratory technician Gerson Mello Souza, for his support with the histochemistry techniques, Patricia Azevedo, for her assistance with histochemical analysis, and Rafaela Tadei, for her assistance related to survival analysis and lethal mean time. We would also like to thank the “Brazilian National Council for Scientific and Technological Development” (CNPq) (grant number 400540/21097-3) for their support regarding the acquisition of bees colonies.

## References

- Alves, R.M.O., Carvalho, C.A.L., Souza, B.A., Santos, W.S., 2012. Areas of natural occurrence of *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) in the state of Bahia, Brazil. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 84 (3), 679–688. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000300010>
- Alves, D.A., Imperatriz-Fonseca, V.L., Franco, T.M., Santos-Filho, P.S., Nogueira-Neto, P., Billen, J., Wenseleers, T., 2009. The queen is dead—long live the workers: intraspecific parasitism by workers in the stingless bee *Melipona scutellaris*. *Mol. Ecol.* 18 (19), 4102–4111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04323.x>
- Arena, M.V.N., Martines, M.R., Silva, T.N., Destéfani, F.C., Mascotti, J.C.S., Silva-Zacarin, E.C.M., Toppa, R.H., 2018. Multiple-scale approach for evaluating the occupation of stingless bees in Atlantic forest patches. *For. Ecol. Manag.* 430, 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.08.038>
- Arena, M., Sgolastra, F., 2014. A meta-analysis comparing the sensitivity of bees to pesticides. *Ecotoxicology* 23 (3), 324–334. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1190-1>
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 649–662.

<https://doi.org/10.1002/ps.520>

Batista, A.C., Domingues, C.E.C., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M., 2020. Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees? *J. Apic. Res.* 59, 1–10. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.* 22 (1), 25–34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>.

Boyle, N.K., Pitts-Singer, T.L., Abbott, J., Alix, A., Cox-Foster, D.L., Hinarejos, S., Lehmann, D.M., Morandin, L., O’Neill, B., Raine, N.E., Singh, R., Thompson, H.M., Williams, N.M., Steeger, T., 2019. Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. *Environ. Entomol.* 48, 4–11. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy103>.

Brandt, C.R., Adang, M.J., Spence, K.D., 1978. The peritrophic membrane: Ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgia pseudotsugatai*. *J. Invertebr. Pathol.* 32 (1), 12–24. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(78\)90169-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90169-6)

Brosi, B.J., 2009. The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. *For. Ecol. Manag.* 258 (9), 1830–1837. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.02.025>

Brown, C., Albrecht, C., 2001. The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. *J. Biogeogr.* 28, 623–634. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2001.00583.x>

Brown, J.C., Oliveira, M.L., 2014. The impact of agricultural colonizations and deforestation on stingless bee (Apidae: Meliponini) composition and richness in Rondônia, Brazil. *Apidologie* 45, 172–188. <https://doi.org/10.1007/s13592-013-0236-3>

Bruckman, D., Campbell, D.R., 2014. Floral neighborhood influences pollinator assemblages and effective pollination in a native plant. *Oecologia* 176, 465–476. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3023-6>

Caccia, S., Casartelli, M., Tettamanti, G., 2019. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. *Cell Tissue Res.* 377 (3), 505–525. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>.

Campbell, J.B., Nath, R., Gadau, J., Fox, T., Degrandi-Hoffman, G., Harrison, J.F., 2016. The fungicide Pristine® inhibits mitochondrial function in vitro but not flight metabolic rates in honey bees. *J. Insect Physiol.* 86, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.003>

Carneiro, L.S., Martínez, L.C., Gonçalves, W.G., Santana, L.M., Serrão, J.E., 2020. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 189, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109991>

Castro, M.B.A., Martinez, L.C., Cossolin, J.F.S., Serra, R.S., Serrão, J.E., 2020. Cytotoxic

effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere* 248, 1–11.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126075>

Catae, A.F., Roat, T.C., Oliveira, R.A., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2014. Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and Malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 77 (4), 274–281.

<https://doi.org/10.1002/jemt.22339>

Cavalcanti, V.M., Cruz-Landim, C., 2004. Electrophoretic protein pattern and acid phosphatase activity in the midgut extracts of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae) during metamorphosis. *Neotrop. Entomol.* 33 (2), 169–172. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2004000200007>

Cham, K.O., Nocelli, R.C.F., Borges, L.O., Viana-Silva, F.E.C., Tonelli, C.A.M., Malaspina, O., Menezes, C., Rosa-Fontana, A.S., Blochtein, B., Freitas, B.M., Pires, C.S.S., Oliveira, F.F., Contrera, F.A.L., Torezani, K.R.S., Ribeira, M.F., Siqueira, M.A.L., Rocha, M.C.L.S.A., 2019. Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. *Environ. Entomol.* 48 (1), 36–48. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy137>

Chauzat, M.P., Faucon, J.P., Martel, A.C., Lachaize, J., Cougoule, N., Aubert, M., 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *J. Econ. Entomol.* 99 (2), 253–262. <https://doi.org/10.1093/jee/99.2.253>

Costa, L.M., Grella, T.C., Barbosa, R.A., Malaspina, O., Nocelli, R.C.F., 2015. Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 62 (4), 578–582.

<http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.792>

Cruz-Landim, C., Rodrigues, L., 1967. Comparative anatomy and histology of the alimentary canal of adult Apinae. *J. Apic. Res.* 6 (1), 17–18.

<https://doi.org/10.1080/00218839.1967.11100156>

Cruz-Landim, C., Serrão, J.E., 1997. Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera, Apidae). *Neth. J. Zool.* 41, 1–9.

Degrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Watkins, D.E., Chambers, M.L., Hidalgo, G., 2015. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. *J. Econ. Entomol.* 108 (6), 2518–2528. <https://doi.org/10.1093/jee/tov251>

Diao, Q., Yuan, K., Liang, P., Gao, X., 2005. Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera ligustica* Spinola. *J. Apic. Res.* 45 (3), 145–152. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101333>

Domingues, C.E.C., Abdalla, F.C., Balsamo, P.J., Pereira, B.V.R., Hausen, M.A., Costa, M.J., Silva-Zacarin, E.C.M., 2017. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. *Chemosphere* 186, 994–1005. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.133>

- Dorigo, A.S., Rosa-Fontana, A.S., Soares-Lima, H.M., Galaschi-Teixeira, J.S., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., 2019. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. PLoS One 14 (9), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213109>
- Domingues, C.E.C., Inoue, L.V.B., Silva-Zacarin, E.C.M., Malaspina, O., 2020. Foragers of africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees. Environ. Pollut. 266 (2), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115267>.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol. Pathol. 35 (4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Ferreira, F.C., Cruz-Landim, C., 2004. Comparative study of the midgut morphology and digestive parameters in workers, queens and males of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae, Apinae). Naturalia 29, 39–48.
- Fidder, B.N., Reátegui-Zirena, E.G., Olson, A.D., Salice, C.J., 2016. Energetic endpoints provide early indicators of life history effects in a freshwater gastropod exposed to the fungicide, pyraclostrobin. Environ. Pollut. 211, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.018>
- Fisher, A., Coleman, C., Hoffmann, C., Fritz, B., Rangel, J., 2017. The synergistic effects of almond protection fungicides on honey bee (Hymenoptera: Apidae) forager survival. J. Econ. Entomol. 110 (3), 802–808. <https://doi.org/10.1093/jee/tox031>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347 (6229), 1–16. <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Grella, T.C., Soares-Lima, H.M., Malaspina, O., Nocelli, R.C.F., 2019. Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. Chemosphere 236, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.225>
- Heard, T.A., 1999. The role of stingless bees in crop pollination. Annu. Rev. Entomol. 44, 183–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.183>
- Hlina, B.L., Birceanu, O., Tessier, L.R., Robinson, C., Muhametsafina, A., Bragg, L.M., Servos, M.R., Wilkie, M.P., 2018. Changes in the sensitivity of piscicide in an invasive species. Environ. Sci. Technol.
- Hooser, E.A., Belden, J.B., Smith, L.M., McMurry, S.T., 2012. Acute toxicity of three strobilurin fungicide formulations and their active ingredients to tadpoles. Ecotoxicology 21 (5), 1458–1464. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0899-y>
- ICMBio, 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Brasília, D.F., Brazil.
- Imperatriz-Fonseca, V., Saraiva, A.M., Gonçalves, L., 2007. The Brazilian pollinators initiative and the advances for the comprehension of the role of pollinators as ecosystem services providers. Biosci. J. 23 (1), 100–106.

Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D., Ellis, M.D., 2013. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (*Apis mellifera*). PLoS One 8 (1), 1–10.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054092>

Junqueira, L.C.U., Junqueira, L.M.M.S., 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia, first ed. Editora Santos, São Paulo.

Kerr, W.E., 1997. A importância da meliponicultura para o país. Biotecnol. Cienc. Desenvolv. 3 (1), 42–44.

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26 (4), 239–257.  
<https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

Klein, A.M., Steffan-Dewenter, I., Tscharntke, T., 2003. Fruit set of highland coffee increases with the diversity of pollinating bees. Proc. Biol. Sci. 270 (1518), 955–961.  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2306>

Kremen, C., Williams, N.M., Thorp, R.W., 2002. Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99 (26), 16812–16816.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.262413599>

Kubik, M., Nowacki, J., Pidek, A., Warakomska, Z., Michalczyk, L., Goszczyński, W., 1999. Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. Apidologie 30 (6), 521–532.  
<https://doi.org/10.1051/apido:19990607>

Leite, D.T., Sampaio, R.B., Santos, C.O., Chambó, E.D., Carvalho, C.A.L., Sodré, G.S., 2018. Toxicity of fenpyroximate, difenoconazole and mineral oil on *Apis mellifera* L. Sociobiology 65 (4), 737–743. <https://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v65i4.3416>

Lima, M.A., Martins, G.F., Oliveira, E.E., Guedes, R.N., 2016. Agrochemical-induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol. 202 (9-10), 733–747.  
<https://doi.org/10.1007/s00359-016-1110-3>

Lopes, M.P., Fernandes, K.M., Tomé, H.V.V., Gonçalves, W.G., Miranda, F.R., Serrão, J.E., Martins, G.F., 2018. Spinosad-mediated effects on the walking ability, midgut, and Malpighian tubules of Africanized honey bee workers. Pest Manag. Sci. 74 (6), 1311–1318.  
<https://doi.org/10.1002/ps.4815>

Lourenço, C.T., Carvalho, S.M., Malaspina, O., Nocelli, R.C.F., 2012a. Determination of fipronil LD50 for the Brazilian bee *Melipona scutellaris*. Julius-Kühn-Arch. 437, 174–178.  
<https://doi.org/10.5073/jka.2012.437.046>

Lourenço, C.T., Carvalho, S.M., Malaspina, O., Nocelli, R.C.F., 2012b. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89 (4), 921–924. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0773-x>.

Malagodi-Braga K.S., Kleinert A.M.P., 2004. Could *Tetragonisca angustula* Latreille (Apinae, Meliponini) be used as strawberry pollinator in greenhouses? Aust. J. Agric. Res. 55 (7), 771–773. <https://doi.org/10.1071/AR03240>

Mao, W., Schuler, M.A., Berenbaum, M.R., 2017. Disruption of quercetin metabolism by fungicide affects energy production in honey bees (*Apis mellifera*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114 (10), 2538–2543. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614864114>

Mapa (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), 2020. Fungicida. [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). (Accessed 17 April 2020).

Ma, J., Cheng, C., Du, Z., Li, B., Wang, J., Wang, Z., Zhu, L., 2019. Toxicological effects of pyraclostrobin on the antioxidant defense system and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). Ecol. Indic. 101, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.015>

McManus, J.F.A., 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. Nature 158, 202. <https://doi.org/10.1038/158202a0>

McManus, J.F.A., 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technol. 23 (3), 99–108. <https://doi.org/10.3109/10520294809106232>

Michener, C., 2007. The Bees of the World, second ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Morais, C.R., Travençolo, B.A.N., Carvalho, S.M., Beletti, M.E., Santos, V.S.V., Campos, C.F., Campos Júnior, E.O., Pereira, B.B., Neves, M.P.C., Rezende, A.A.A., Spanó, M.A., Vieira, C.U., Bonetti, A.M., 2018. Ecotoxicological effects of the insecticide fipronil in Brazilian native stingless bees *Melipona scutellaris* (Apidae: Meliponini). Chemosphere 206, 632–642. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.153>

Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., Pettis, J.S., 2010. High levels of miticides and agrochemicals in north American apiaries: implications for honey bee health. PLoS One 5 (3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>

Nicodemo, D., Mingatto, F.E., De Jong, D., Bizerra, P.F.V., Tavares, M.A., Bellini, W.C., Vicente, E.F., Carvalho, A., 2020. Mitochondrial respiratory inhibition promoted by pyraclostrobin in fungi is also observed in honey bees. Environ. Toxicol. Chem. 39 (6), 1267–1272. <https://doi.org/10.1002/etc.4719>

Nocelli, R.C.F., Soares, S.M.M., Monquero, P.A., 2019. Effects of herbicides on the survival of the Brazilian native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). Planta Daninha 37, 1–8. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582019370100156>

Nogueira-Neto, P., 1997. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão, first ed. Editora Nogueirapis, São Paulo.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 1998. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Honeybees, Acute Oral Toxicity Test n°213.

Oliveira, C.R., Domingues, C.E.C., Melo, N.F.S., Roat, T.C., Malaspina, O., Jones-Costa, M., Silva-Zacarin, E.C.M., Fraceto, L.F., 2019. Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. *Chemosphere* 236, 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.013>

Oliveira, H.H., Kleinert-Giovannini, A., 1991. Influência da sazonalidade na divisão de trabalho entre operárias de *Melipona scutellaris* Latreille (Apidae, Meliponinae). *Ciênc. Cult.* 43 (7), 758.

Oliveira, R.A., Roat, T.C., Carvalho, S.M., Malaspina, O., 2014. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the Africanized honeybee (Hymenoptera: Apidae). *Environ. Toxicol.* 29 (10), 1122–1133.  
<https://doi.org/10.1002/tox.21842>

Page Jr., R.E., Peng, C.Y. 2001. Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Exp. Gerontol.* 36 (4–6), 695–711.  
[https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00236-9)

Pedro, S.R.M., 2014. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 61 (4), 348–354. <http://dx.doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>

Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, R., vanEngelsdorp, D., 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. *PLoS One* 8 (7), 1–9.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>

Pires, C.S.S., Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Nocelli, R.C.F., Malaspina, O., Pettis, J.S., Teixeira, E.W., 2016. Weakness and collapse of bee colonies in Brazil: are there cases of CCD? *Pesqui. Agropecu. Bras.* 51, 422–442.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500003>

Prado, F.S.R., Santos, D.M., Oliveira, T.M.A., Burgarelli, J.A.M., Castele, J.B., Vieira, E.M., 2020. Determination and uptake of abamectin and difenoconazole in the stingless bee *Melipona scutellaris* Latreille (1811) via oral and topic acute exposure. *Environ. Pollut.*  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114313>

Putra, R.E., Permana, A.D., Kinasih, I., 2014. Application of asiatic honey bees (*Apis cerana*) and stingless bees (*Trigona laeviceps*) as pollinator agents of hot pepper (*Capsicum annum* L.) at local Indonesia farm system. *Psyche* 2014, 1–5.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/687979>

Ramirez, V.M., Ayala, R., Gonzáles, H.D., 2018. Crop pollination by stingless bees, in: Vit, P., Pedro, S.R.M., Roubik, D.W. (Eds.), *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*. Springer, Cham, pp. 139–153.

Ryerse, J.S., 1979. Developmental changes in Malpighian tubule cell structure. *Tissue Cell* 11 (3), 533–551. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(79\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0040-8166(79)90061-2)



- Santos, S.A., Roselino, A.C., Hrnecir, M., Bego, L.R., 2009. Pollination of tomatoes by the stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Genet. Mol. Res. 8 (2), 751–757. <https://doi.org/10.4238/vol8-2kerr015>
- Serrão, J.E., Ronnau, M., Neves, C.A., Campos, L.A.O., Zanuncio, J.C., 2008. Ultrastructure of anterior midgut region of corbiculate bees (Hymenoptera: Apidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 101 (5), 915–921. <https://doi.org/10.1093/aesa/101.5.915>
- Silva-Zacarin, E.C.M., 2007. Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Autophagy 3 (5), 516–518.
- Silva-Zacarin, E.C.M., Chauzat, M.P., Zeggane, S., Drajnudel, P., Schurr, F., Faucon, J.P., Malaspina, O., Engler, J.A., 2012. Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Current microscopy contributions to advances in science and technology. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 696–703.
- Silva-Zacarin, E.C.M., Costa-Ferreira, R.A., Nocelli, R.C.F., Roat, T.C., Palma, M.S., Malaspina, O. 2011. Structure and function of the intestine and Malpighian tubules - from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. In: Stewart, E.M. (Ed.), Social Insects - Structure, Function, and Behavior. Nova Publishers, Hauppauge, New York, pp. 121–142.
- Silva, C.I., Aleixo, K.P., Nunes-Silva, B., Freitas, B.M., Imperatriz-Fonseca, V.L., 2014. Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras no Brasil. Instituto de Estudos Avançados, first ed. Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Silveira, F.S., Melo, G.A.R., Almeida, E.A.B., 2002. Abelhas Brasileiras, Sistemática e Identificação, first ed. Fernando A. Silveira, Belo Horizonte.
- Slaa, E.J., Chaves, L.A.S., Malagodi-Braga, K.S., Hofstede, F.E., 2006. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. Apidologie 37 (2), 293–315. <https://doi.org/10.1051/apido:2006022>
- Smith, D.S., 1968. Insect cells: their structure and function, first ed. Oliver & Boyd, Edinburg.
- Snodgrass, R.E., 1956. Anatomy of the honeybee, first ed. Comstock Publishing, Ithaca.
- Tadei, R., Domingues, C.E.C., Malaquias, J.B., Camilo, E.V., Malaspina, O., Silva-Zacarin, E.C.M., 2019. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. Sci. Rep. 9 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>
- Tadei, R., Menezes-Oliveira, V.B., Silva-Zacarin, E.C.M., 2020. Silent effect of the fungicide pyraclostrobin on the larval exposure of the non-target organism Africanized *Apis mellifera* and its interaction with the pathogen *Nosema ceranae* in adulthood. Environ. Pollut. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115622>

Terra, W.R., 2001. The origin and function of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arc. Insect Biochem. Physiol.* 47 (2), 47–61.

<https://doi.org/10.1002/arch.1036>

Terra, W.R., Ferreira, C., 2012. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilberste, L.I. (Ed.), *Insect molecular biology and biochemistry*. Academic Press, London, pp. 365–418.

Therneau, T.M., 2015. A Package for Survival Analysis in S. R package version 2.38.

<https://cran.r-project.org/package=survival>

Therneau, T.M., Grambsch, P.M., 2000. *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*, first ed. Springer, New York.

Tomé, H.V.V., Ramos, G.S., Araújo, M.F., Santana, W.C., Santos, G.R., Guedes, R.N.C., Maciel, C.D., Newland, P.L., Oliveira, E.E., 2017. Agrochemical synergism imposes higher risk to Neotropical bees than to honeybees. *R. Soc. Open Sci.* 4 (1), 1–11.

<https://doi.org/10.1098/rsos.160866>

Tong, Z., Duan, J., Wu, Y., Liu, Q., He, Q., Shi, Y., Yu, L., Cao, H., 2018. A survey of multiple pesticide residues in pollen and beebread collected in China. *Sci. Total Environ.* 640–641, 1578–1586.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.424>

Willming, M. M., Maul, J.D., 2016. Direct and indirect toxicity of the fungicide pyraclostrobin to *Hyalomma azteca* and effects on leaf processing under realistic daily temperature regimes. *Environ. Pollut.* 211, 435–442.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.029>

Winston, M.L., 1992. The biology and management of Africanized honey bees. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 173–193.

<https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001133>

Yoder, J.A., Jajack, A.J., Rosselot, A.E., Smith, T.J., Yerke, M.C., Sammataro, D., 2013. Fungicide contamination reduces beneficial fungi in bee bread based on an area-wide field study in honey bee, *Apis mellifera*, colonies. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A* 76 (10), 587–600.

<https://doi.org/10.1080/15287394.2013.798846>

Zaluski, R., Justulin, L.A., Orsi, R.D.O., 2017. Field-relevant doses of the systemic insecticide fipronil and fungicide pyraclostrobin impair mandibular and hypopharyngeal glands in nurse honeybees (*Apis mellifera*). *Sci. Rep.* 7, 1–10.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-15581-5>

Zhang, C., Wang, J., Zhang, S., Zhu, L., Du, Z., Wang, J., 2017. Acute and subchronic toxicity of pyraclostrobin in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 188, 510–516.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.09.025>

## 6 CAPÍTULO 4

A pesquisa referente a este capítulo foi conduzida durante o período da Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE - FAPESP nº 2018/05072-3), entre os meses de outubro de 2018 a final de agosto de 2019, no *Soil Ecology and Ecotoxicology Laboratory* (SEEL) do *Centre for Functional Ecology* (CFE) da Universidade de Coimbra - Portugal. O capítulo será submetido em revista científica especializada da área de ecologia.

## **Abordagem multifatorial para avaliar os efeitos da exposição ao acetamiprida em colônias de *Apis mellifera iberiensis* em plantações de *Eucalyptus***

Caio Eduardo da Costa Domingues<sup>ab\*</sup>; Nuno Xavier Jesus Capela<sup>a</sup>; Artur Miguel Paiva Sarmiento<sup>a</sup>; Osmar Malaspina<sup>b</sup>; Henrique Azevedo-Pereira<sup>a</sup>; José Paulo Sousa<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Ecologia Funcional, Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

<sup>b</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP) - “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências (IB), Departamento de Biologia, Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), Rio Claro, SP, Brasil

### **RESUMO**

As plantações de eucaliptos, destinadas principalmente para a produção de papel, ocupam grande parte da área florestal do território continental de Portugal. Nesse sentido, muitos apicultores mantêm suas colônias de *Apis mellifera* no interior ou próximas das plantações para a produção do mel. No entanto, as plantações de eucaliptos, assim como outras monoculturas, são altamente susceptíveis a diferentes pragas. O uso de agrotóxicos para o controle destas pragas pode oferecer riscos as abelhas que forrageiam nessa área e consequentemente as colônias, sendo de extrema importância analisar os efeitos da sua aplicação. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi realizar uma avaliação multifatorial do estado de saúde e desenvolvimento das colônias de *A. mellifera iberiensis* em duas plantações de *Eucalyptus globulus*, com uma área referência, controle, e outra com aplicação de inseticida. Duas janelas de paisagens foram selecionadas para a instalação de oito colônias em cada local, onde foram monitoradas antes e após aplicação pontual do inseticida acetamiprida para os seguintes parâmetros: desenvolvimento por meio da quantificação de células do ninho, população adulta, quantidade de recursos e estado sanitário; análises de multiresíduos e análise de resíduos de acetamiprida; atividade de forrageamento e análise palinológica do pólen e do mel. Os resultados obtidos evidenciaram que a aplicação pontual de acetamiprida não alterou o estado de saúde e desenvolvimento das colônias. Não obstante, foram detectados resíduos de acetamiprida um e 16 dias após aplicação em amostras de pólen e *bee bread*. No presente estudo, destacamos que os parâmetros de monitoramento utilizados fornecem informações confiáveis do desenvolvimento das colônias e podem contribuir para um melhor manejo na aplicação de agrotóxicos em áreas de produção intensiva e diminuir o risco de exposição para as abelhas.

**Palavras-chave:** Abelha melífera. Análise de risco. Estudo de campo. Inseticida. Monoculturas.

## 1 INTRODUÇÃO

A polinização é um serviço vital para a preservação da estrutura dos ecossistemas terrestres (COSTANZA *et al.*, 2017). Este serviço ecossistêmico é também muito importante do ponto de vista econômico em culturas agrícolas (KLEIN *et al.*, 2007), onde a diversidade de polinizadores é essencial no processo de reprodução das plantas (OLLERTON, 2017). De acordo com Ollerton, Winfree e Tarrant (2011), a grande maioria das espécies vegetais com flores é dependente da polinização animal. Segundo Aizen *et al.* (2009), ao longo do tempo a agricultura tornou-se mais dependente dos polinizadores e na ausência de polinização animal é esperada uma redução direta de 3-8% na produção agrícola em escala global, interferindo na diversidade das culturas. Nesse sentido, as abelhas se sobressaem como o maior grupo de polinizadores animais, imprescindíveis na polinização da flora nativa e de culturas agrícolas (KLEIN *et al.*, 2007; HUNG *et al.*, 2018).

Dentre a grande diversidade de abelhas descritas (MICHENER, 2007), a espécie *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) é reconhecidamente a abelha manejada mais utilizada (vanENGELSDORP; MEIXNER, 2010). Difundida em praticamente todo o planeta (GUPTA, 2014), essa espécie possui colônias numerosas, apresenta amplas faixas de forrageamento e tem ainda a capacidade de visitar flores de diferentes formas/tamanhos. Associado a estes fatores vem a comercialização de seus produtos apícolas, que contribui para que se destaque como um dos principais polinizadores de importância econômica (MORSE; CALDERONE, 2000; CALDERONE, 2012; HUNG *et al.*, 2018).

Embora forneçam muitos benefícios, suas populações sofreram perdas severas nas últimas décadas na síndrome que foi denominada de *Colony Collapse Disorder* (CCD), como descrito inicialmente nos Estados Unidos da América e na Europa (UNDERWOOD; vanENGELSDORP, 2007; vanENGELSDORP *et al.*, 2009; vanENGELSDORP *et al.*, 2010; NEUMANN; CARRECK, 2010; DAINAT; vanENGELSDORP; NEUMANN, 2012). As perdas de colônias estão associadas a múltiplos fatores estressores, dos quais podem-se destacar: perda de habitats, doenças e parasitas, alterações climáticas, aumento do tamanho dos campos de cultura, simplificação e homogeneização de paisagens e o uso de agrotóxicos, que é considerado um dos fatores mais relevantes com risco associado para as abelhas (TSCHARNTKE *et al.*, 2005; ODOUX *et al.*, 2014; GOULSON *et al.*, 2015).

Atualmente, o território de Portugal contabiliza 845.000 hectares ocupados por plantações de eucaliptos, o que representa 26% da floresta continental, e um aumento de 127.800 hectares em um período de 20 anos (1995-2015) (ICNF, 2015). Introduzido em

Portugal no século 19, *Eucalyptus globulus* Labill é uma espécie nativa da Austrália (JORDAN *et al.*, 1994) que se estabeleceu muito bem em diferentes regiões do país (CATRY *et al.*, 2015), onde representa alto valor econômico principalmente como matéria-prima para a produção de papel e celulose (VALENTE; MACHADO; SILVA, 2008), além da utilização na indústria farmacêutica. A importância como fonte de recursos para a produção de mel também é reconhecida no centro e nordeste de Portugal, uma vez que muitos apicultores mantêm colônias de *A. mellifera iberiensis* no interior ou nas proximidades das plantações de eucaliptos (KARABAGIAS *et al.*, 2018).

Segundo Kovács-Hostyánszki *et al.* (2017), a ausência de diversidade em áreas com monoculturas torna essas paisagens vulneráveis a pragas e conseqüentemente mais propensas ao uso de agrotóxicos. Alguns estudos têm demonstrado que as plantações de eucaliptos são altamente susceptíveis a infestações por pragas agrícolas, assim como outras monoculturas, principalmente pelo besouro desfolhador *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) (MANSILLA-VÁZQUEZ; PÉREZ-OTERO, 1996; SOUSA; FERREIRA, 1996; VALENTE; MACHADO; SILVA, 2008). Conhecido popularmente como gorgulho-do-eucalipto, é uma espécie nativa da Austrália que foi introduzida acidentalmente em outras regiões do mundo e pode causar desfolhações severas nas plantações (HURLEY *et al.*, 2016), representando grandes perdas na produção de madeira (CORDERO-RIVERA; SANTOLAMAZZA-CARBONE; ANDRES, 1999; LOCH; MATSUKI, 2010). Atualmente, os métodos utilizados para combater esse besouro praga são o controle biológico e o controle químico (REIS *et al.*, 2012).

A vespa parasitoide *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) é comumente a estratégia utilizada no controle biológico do *G. platensis* e, embora seja eficaz, sua efetividade diminui drasticamente com a altitude, sendo eficiente até 400 metros e se estima que um terço das plantações de eucaliptos em Portugal estejam localizadas em áreas acima de 450 metros (REIS *et al.*, 2012). Como forma de evitar perdas na produção de madeira em regiões onde a implementação do controle biológico ainda não é efetiva, a aplicação de agrotóxicos contra o *G. platensis* é utilizada (LOCH, 2005; ECHEVERRI-MOLINA; SANTOLAMAZZA-CARBONE, 2010).

Diferentes moléculas como azadiractina, flufenoxuron, deltametrina, etofenprox, lufenuron, flufenoxuron (PÉREZ-OTERO; MANSILLA-VÁZQUES; RODRÍGUEZ IGLESIAS, 2003), lambda-cialotrina, cipermetrina e tiametoxam (ECHEVERRI-MOLINA; SANTOLAMAZZA-CARBONE, 2010) foram testadas quanto sua eficiência no controle de

*G. platensis* (SANTOLAMAZZA-CARBONE; ANA-MAGÁN, 2004). Segundo o Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas - ICNF (2015), os produtos homologados que estão autorizados para utilização em Portugal são os inseticidas Calypso® (tiacloprido como ingrediente ativo) e o Epik SG® (acetamiprida como ingrediente ativo). Ambos os produtos demonstraram bons resultados no controle de *G. Platensis*.

Entretanto, o uso destes inseticidas pode oferecer riscos a organismos não-alvo por serem pertencentes ao grupo químico dos neonicotinóides, que atuam por ingestão ou contato e o mecanismo de ação causa hiperexcitação, paralisia e morte do inseto (TOMIZAWA; CASIDA, 2003; WOOD; GOULSON, 2017). Por não serem seletivos, as forrageiras de *A. mellifera iberiensis* podem ser potencialmente expostas aos agrotóxicos usados nas plantações de eucaliptos ou nas proximidades de apiários devido as atividades agrícolas. Estas moléculas podem ser acumuladas no interior das colônias, prejudicando o seu desenvolvimento (HENRY *et al.*, 2012b). Inúmeros estudos utilizando concentrações subletais dos neonicotinóides destacaram efeitos prejudiciais na aprendizagem e memória das abelhas, comprometendo atividades como o forrageamento (HENRY *et al.*, 2012a; WILLIAMSON; WRIGHT, 2013; FAIRBROTHER *et al.*, 2014; TISON *et al.*, 2019), e na morfofisiologia de órgãos de larvas e adultos (ROAT *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2015; DOMINGUES *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2017; TAVARES *et al.* 2019; TADEI *et al.*, 2019). Estudos conduzidos em laboratório demonstraram efeitos adversos do tiacloprido e da acetamiprida em abelhas melíferas (ALIOUANE *et al.*, 2009; VIDAU *et al.*, 2011; TISON *et al.*, 2017; BRANDT *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020a; WANG; ZHU; LI, 2020).

Apesar dos efeitos conhecidos dos agrotóxicos nas abelhas em bioensaios laboratoriais, ainda faltam estudos de campo onde as colônias são expostas a concentrações ambientalmente realistas (HEIMBACH *et al.*, 2017). A avaliação regulatória de risco, no continente europeu, prescrita para abelhas não leva em consideração múltiplas exposições ou estressores combinados, ignorando efeitos aditivos ou sinérgicos (RORTAIS *et al.*, 2013). Ademais, é de grande importância avaliar como o gerenciamento da paisagem, a organização e composição espacial afetam a disponibilidade de recursos e quais são as consequências para o desenvolvimento das colônias (VIANA *et al.*, 2012). Para abordar essas múltiplas variáveis, modelos como o *BEEHAVE* (BECHER *et al.*, 2014) foram criados, mas são apontados como ineficientes do ponto de vista regulatório devido à falta de um módulo de agrotóxicos (EFSA, 2015).

Como forma de suprir essas lacunas de conhecimento, este trabalho pretende aplicar uma abordagem multifatorial para avaliar os efeitos da aplicação de acetamiprida no entorno das colônias de abelhas, *A. mellifera iberiensis*, em paisagens dominadas pelas plantações de eucaliptos. Nesse sentido, justifica-se a realização de um monitoramento aprofundado do *status* das colônias localizadas em plantações de eucaliptos, adotando uma abordagem multiestressor, considerando padrões de uso de agrotóxicos e exposição potencial, estrutura e manejo da paisagem, incluindo disponibilidade de recursos, e prevalência de doenças. Além disso, os dados compilados a partir desta avaliação fornecerão informações para ajudar na validação e melhoramento do novo modelo mecanicista do *ApisRAM* para avaliar riscos às colônias de abelhas, proposto pela EFSA (2016a).



## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é monitorar e avaliar, utilizando uma abordagem multifatorial, o estado de saúde e desenvolvimento de colônias de *A. mellifera iberiensis* pré e pós-aplicação do inseticida acetamiprida em uma paisagem dominada por plantações de eucaliptos.

### 2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar a demografia de indivíduos adultos de *A. mellifera iberiensis*.
- Avaliar o desenvolvimento das colônias por meio de balanças automáticas e do software *DeepBee*<sup>®</sup>.
- Verificar o estado sanitário e a prevalência de doenças nas colônias.
- Quantificar a presença de resíduos nas colônias derivados da aplicação de acetamiprida.
- Avaliar a disponibilidade de recursos florais nas plantações de eucaliptos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

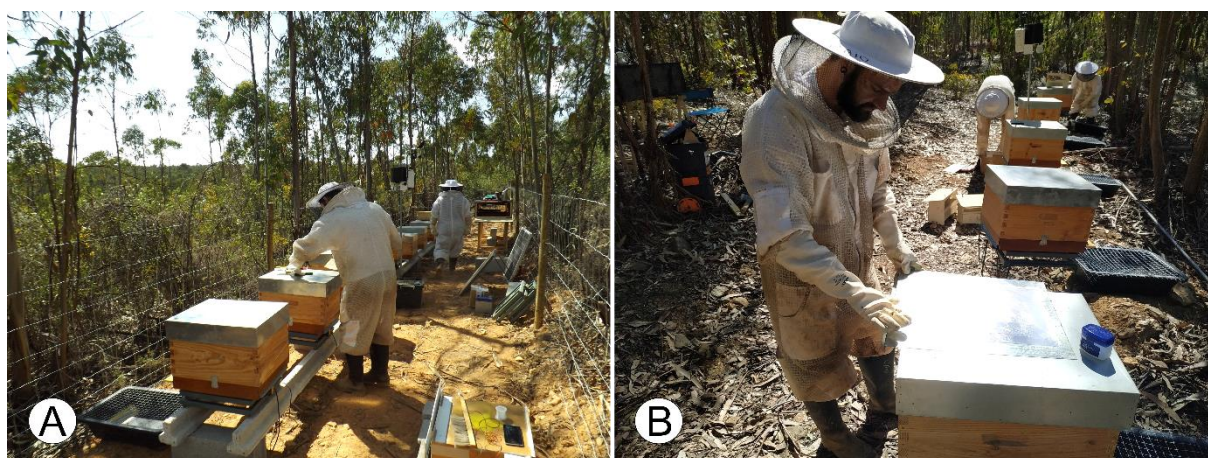
#### 3.1. SELEÇÃO DOS LOCAIS DE ESTUDO E INSTALAÇÃO DOS APIÁRIOS

Para o desenvolvimento do presente estudo, a região central de Portugal continental, por meio do município de Castelo Branco, foi escolhida por atender aos requisitos de alta densidade de áreas florestais com plantações de eucaliptos (*Eucalyptus globulus*). Nessa região, duas janelas de paisagem de 5 Km x 5 Km foram identificadas e selecionadas para instalação dos apiários, baseada em características semelhantes no que se refere ao uso do solo, declive, tipo e densidade de cobertura arbustiva e subarbustiva, exposição solar e o clima. Todas as características escolhidas para padronização das janelas de paisagens foram baseadas em EFSA (2017), para que ambas disponham de *landscape fitness* semelhantes.

Inicialmente, 16 colônias homogêneas não parentais de *A. mellifera iberiensis* em caixas tipo *Langstroth*, visivelmente livre de doenças sintomáticas e parasitas, foram adquiridas para utilização durante o período do estudo. Todas as colônias continham rainhas da mesma idade, com um ano (nascidas em 2018), marcadas para facilitar a detecção de sua presença pelo método de identificação visual (EFSA, 2016a). As colônias iniciaram o estudo com introdução individual de dieta artificial em pasta *Fondabee*<sup>®</sup> 1 Kg (83,5% de sacarose, 11,5% de açúcares superiores, 3% de dextrose e 2% de maltose), prática comum no momento da instalação de um novo apiário e preventiva para manutenção da homogeneidade das colônias.

Aproximadamente no centro de cada uma das duas janelas selecionadas foi instalado um apiário contendo oito colônias (Figura 1), sendo um apiário destinado para ser o local controle (39°58'29.1"N 7°03'59.2"W) e um apiário com aplicação pontual do inseticida neonicotinóide acetamiprida (Epik SG<sup>®</sup>) (40°05'43.8"N 7°01'00.4"W). A distância das colônias para o solo foi padronizada em 60 cm e entre as colônias em um metro e meio para ambos os apiários, como forma de minimizar o *drifting* acidental de abelhas.

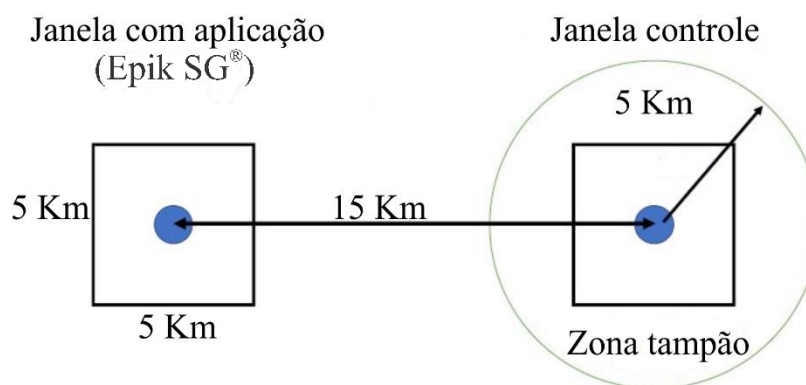
**FIGURA 1** - Instalação dos apiários de *A. mellifera iberiensis* no centro de cada janela de estudo, no município de Castelo Branco em Portugal continental. **A** - Apiário controle. **B** - Apiário com aplicação pontual de Epik SG®.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Para garantir ausência de exposição ao inseticida acetamiprida no apiário controle, foi mantida uma distância de 15 Km entre o centro de cada janela onde foram instalados os apiários e na janela controle foi inserida uma zona tampão adicional (ausência de agrotóxicos) de 5 Km em torno do apiário (Figura 2).

**FIGURA 2** - Esquema representativo das distâncias entre os apiários de cada janela de estudo e da zona tampão adicional do apiário controle.

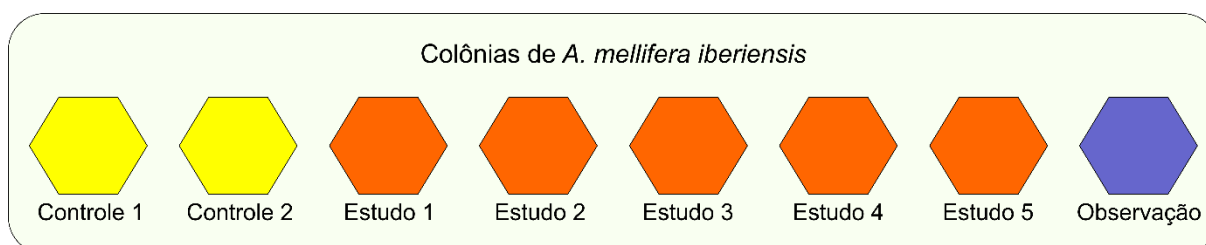


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.2. MONITORAMENTO DOS ATRIBUTOS DAS COLÔNIAS DE *A. mellifera iberiensis*

As técnicas de monitoramento dos parâmetros de desenvolvimento e evolução das colônias e do estado sanitário seguiram as recomendações da EFSA (2016a) e EFSA (2016b). Em cada apiário, cinco colônias foram utilizadas para coleta dos dados e duas colônias foram destinadas como controle, a fim de verificar alguma possível interferência do manejo da coleta de dados no estudo. Adicionalmente, como forma de reunir o máximo de informações do desenvolvimento das abelhas, uma colônia em cada apiário foi destinada apenas para gravar as danças das abelhas (colônia de observação) (Figura 3).

**FIGURA 3** - Esquema representativo da organização das oito colônias de *A. mellifera iberiensis* em cada um dos dois apiários.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As atividades de campo para coleta de dados nos apiários das janelas de estudo foram realizadas em média a cada 19 dias ( $\pm 1$ ), respeitando o ciclo de desenvolvimento de abelhas *A. mellifera iberiensis*. O estudo foi conduzido entre os meses de abril a setembro de 2019, correspondentes ao período apícola de seis meses em Portugal continental. Para efeitos das análises de dados, apenas as colônias de estudo que não enxamearam ( $n = 3$  em cada apiário) foram consideradas no presente estudo.

#### 3.2.1. Peso, manutenção da temperatura e umidade interna e externa

Cada uma das colônias dos dois apiários, exceto as destinadas somente para observação das danças das abelhas, foram equipadas individualmente com uma balança automática (*Apis Technology*) contendo sensores de umidade, temperatura externa e temperatura interna (Figura 4). As balanças, por meio de um sistema denominado *B-Hive*, coletavam os dados de forma contínua diária (de hora em hora) e transmitiam as informações, via *short message service*, para uma plataforma *online*/aplicativo (*B-App*, *Apis Technology*) na qual era possível acessar e monitorar os dados em tempo real. As balanças automáticas

foram ligadas diretamente em uma bateria automotiva (*Ultracell*<sup>®</sup>, 12 volts, 85 Ah), a qual era recarregada por um painel solar fotovoltaico (50 w), sendo possível manter o envio de dados durante 24 horas por dia por todo o período de seis meses do monitoramento.

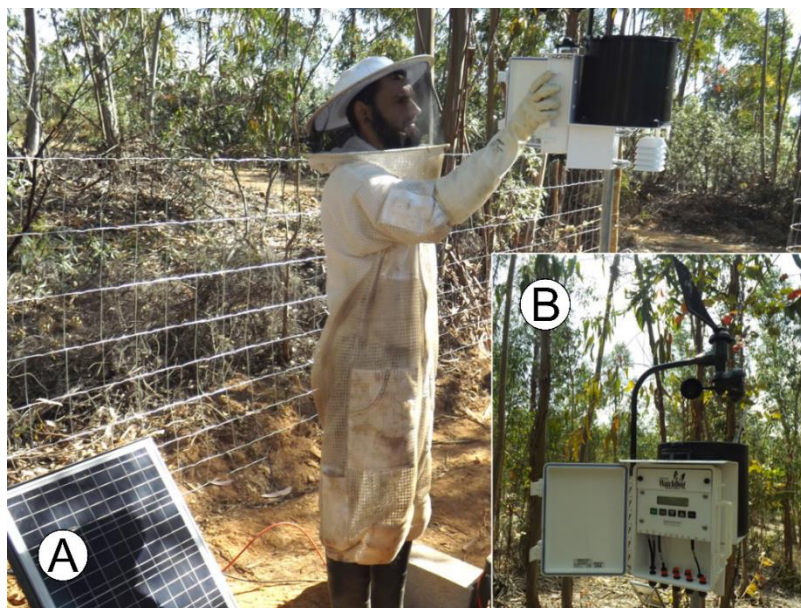
**FIGURA 4** - Colônias de *A. mellifera iberiensis* equipadas individualmente com balanças automáticas contendo sensores de umidade e temperatura interna. **Legenda:** **BA** = balanças automáticas (*Apis Technology*), **S** = sensores de umidade e temperatura interna, **BT** = bateria automotiva, **PS** = painéis solares.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Adicionalmente as balanças automáticas, em cada apiário foi instalada uma estação meteorológica (*WatchDog 2900ET Weather Station*) para monitoramento diário, com periodicidade de registro de uma hora, dos parâmetros climáticos externos que condicionam as atividades das abelhas, como temperatura (°C), umidade relativa (%), pluviosidade (mm), velocidade do vento (Km/h) e radiação solar ( $w/m^2$ ) (Figura 5).

**FIGURA 5** - Instalação e funcionamento das estações meteorológicas nos apiários. **A** - Instalação da estação meteorológica. **B** - Estação meteorológica em funcionamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.2. Demografia e quantidades de reservas

Como forma de quantificar os indivíduos adultos das populações das colônias nos apiários e a produção de mel, cada quadro de cada colônia foi pesado individualmente em uma balança digital tipo gancho (KERN - série HCB, máximo 20 Kg  $\pm$  10 g). Inicialmente, o quadro foi retirado da colônia com auxílio de um sacador de quadros com formão e pesado com todas as abelhas presentes (Figuras 6A-B), após esse processo, realizou-se a limpeza com uma vassoura de apicultura (varrendo para dentro da colônia), e o quadro foi pesado sem abelhas (Figuras 6C-D) (ODOUX *et al.*, 2014). Para calcular a população, a diferença de peso entre os quadros com e sem abelhas foi multiplicada por  $1,24 \times 10^{-4}$  Kg/abelha (DELAPLANE; van der STEEN; GUZMAN-NOVOA, 2013). Esta estimativa considerou apenas as abelhas presentes no interior da colônia. Além disso, este processo permite também estimar a quantidade, em quilogramas, de mel dos quadros que continham esse recurso.

**FIGURA 6** - Pesagem dos quadros para quantificação dos indivíduos adultos das populações das colônias de *A. mellifera iberiensis* e estimar a produção de mel. **A** - Coleta do quadro. **B** - Pesagem do quadro com abelhas. **C** - Limpeza do quadro com a vassoura de apicultura. **D** - Pesagem do quadro sem abelhas.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

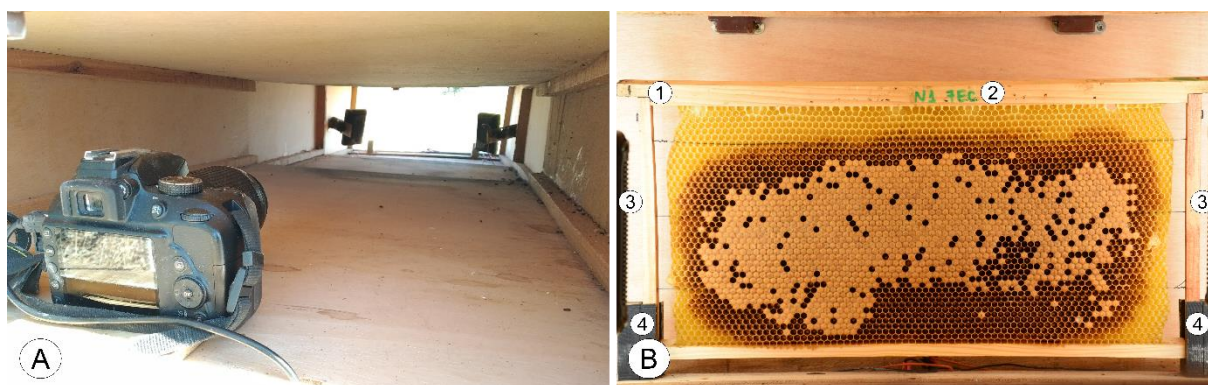
Por sua vez, o desenvolvimento das crias nas colônias e a quantidade de recursos de reservas como pólen, ao longo dos meses de estudo, foi monitorado por meio de análise de imagens (ALVES *et al.*, 2020). Primeiramente, todos os quadros de todas as colônias de estudo foram devidamente identificados com códigos próprios, mantendo a sequência no interior do ninho e facilitando a organização das fotos. Para assegurar a captura de imagens de forma padronizada, um túnel de fotografia retrátil foi desenvolvido com base em Alves *et al.* (2020) (Figura 7), contendo um suporte para fixação da câmera em uma extremidade e na outra, suportes para um quadro com inclinação de 11° e um par de iluminadores (*Led Pro*, 7.5 w) incidindo luz a 45° graus para fotodocumentação com melhor qualidade (Figura 8).

**FIGURA 7** - Túnel instalado nos dois apiários para fotografar os quadros de *A. mellifera iberiensis*. **Legenda:** **c** = local de posicionamento para fixação da câmera fotográfica, **q** = local de posicionamento do quadro e dos iluminadores. **247 cm** - tamanho estendido e **92 cm** - tamanho retraído.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**FIGURA 8** - Equipamentos instalados no interior do túnel para fotodocumentação dos quadros das colônias de *A. mellifera iberiensis*. **A** - Câmera fixada. **B** - Quadro posicionado para fotodocumentação. **Legenda:** **1** = quadro com crias de *A. mellifera iberiensis*, **2** = código de identificação, **3** = iluminadores led, **4** = suportes para o quadro.



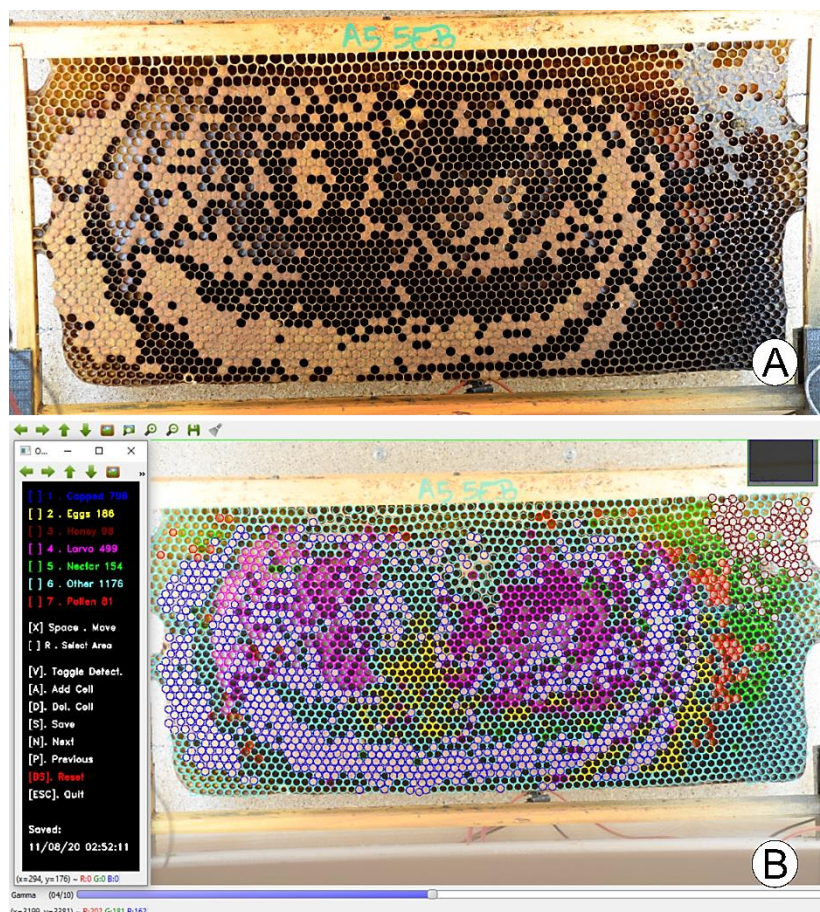
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As imagens foram registradas após a pesagem dos quadros sem abelhas, por meio de uma câmera *Nikon D3300*, equipada com a lente *Nikon AF-S DX Nikkor Telephoto Zoom 55-200mm F/4.0-5.6G VR II*, configurada para: Distância focal - 100 mm, ISO - 100, Foco automático - ligado, *Flash* - desligado, Compressão - JPEG, Resolução de 24 M pixels (6000 x 4000 px) e 300 DPI. Um disparador remoto foi adaptado na câmera para evitar o manuseio e o registro de imagens desfocadas.



Durante o período de condução do estudo, 1286 quadros (686 - apiário controle e 600 - apiário aplicação) foram fotografados de ambos os lados, totalizando 2572 imagens (1372 imagens - apiário controle e 1200 imagens - apiário aplicação). Após os registros, as imagens dos quadros foram analisadas com base no software *DeepBee*<sup>®</sup> (ALVES *et al.*, 2020) por meio da detecção de todo o conteúdo das células dos quadros e pela classificação nas seguintes categorias: ovo, larva, cria operculada, pólen, néctar, mel e outros (células vazias), como desmonstrado na figura (9).

**FIGURA 9** - Detecção e classificação de todas as células presentes no quadro por meio do *software DeepBee*<sup>®</sup>. **A** - Imagem do quadro no túnel de fotografia. **B** - Quadro com as células identificadas e classificadas no *software DeepBee*<sup>®</sup>.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A mortalidade de abelhas das colônias foi quantificada utilizando bacias plásticas (650 x 475 x 160 mm) distribuídas em frente as entradas das colônias (Figura 10). Foram realizados furos na extremidade das bacias para impedir acúmulo de água e uma tela de proteção foi adicionada, evitando predação por aves que inviabilizariam as contagens. As bacias foram colocadas no dia da instalação dos apiários e a cada saída de campo para

monitoramento, as abelhas mortas foram contabilizadas onde obteve-se a mortalidade durante todo o período do estudo (HUMAN *et al.*, 2013).

**FIGURA 10** - Quantificação de abelhas mortas das colônias de *A. mellifera iberiensis*. **A** - Bacia plástica utiliza como recipiente de descarte pelas abelhas. **B** - Contagem manual das abelhas mortas. **C** - Abelhas mortas na bacia plástica.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.2.3. Estado sanitário: identificação e prevalência de agentes infecciosos

Durante todo o monitoramento, o estado sanitário das colônias foi avaliado por meio de inspeção visual para doenças nas colônias, sendo que diferentes sintomas foram observados quanto a sua presença, na qual podemos destacar: falha nas células dos quadros e presença de crias mortas, larvas com características morfológicas e colorações anormais, sinal de fraqueza dos indivíduos adultos, incapacidade de voar, asas deformadas, comportamentos atípicos de forrageiras (paralisia aguda), odor pútrido, presença de fungos, presença de *Aethina tumida* (Coleóptera), *Galleria mellonella* (Lepidóptera) e *Vespa velutina* (Hymenoptera) (EFSA, 2016b).

Para detectar e quantificar possíveis infestações pelo ácaro *Varroa destructor* (Anderson & Trueman, 2000), a metodologia de *sticky board* foi realizada (FLORES; GIL; PADILLA, 2015). Folhas de papel sulfite A3 (29,7 x 42 cm) foram totalmente cobertas com

vaselina (100% pura) e colocadas, individualmente, sobre as bases sanitários de todas as colônias por um período de 24 horas. Posteriormente, o número total de ácaros foi contabilizado de acordo com a fórmula  $(306,247 + 9,38 * \text{queda natural dos ácaros ao longo de quatro dias})$  proposta por Flores, Gil e Padilla (2015) (Figura 11).

**FIGURA 11** - Instalação de uma folha sulfite A3 coberta com vaselina na base sanitária de uma colônia de *A. mellifera iberiensis*, para detecção e quantificação do ácaro *V. destructor*.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.3. APLICAÇÃO DE ACETAMIPRIDA (Epik SG<sup>®</sup>) E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO

No presente estudo, foi realizada uma aplicação pontual do inseticida neonicotinóide acetamiprida (27/05/2019), por meio do produto formulado Epik SG<sup>®</sup> (20 % (p/p) de acetamiprida), em uma das janelas de estudo pré-determinada (40°05'43.8"N 7°01'00.4"W). A concentração utilizada foi de 0,8 L/ha, o que significa uma concentração de 40 g s.a./ha. A aplicação estimada de 24 L de Epik SG<sup>®</sup> aconteceu no período da manhã, com o débito do pulverizador calibrado em 50 L/h seguindo as condições ambientais recomendadas favoráveis à absorção e translocação do produto, como temperatura atmosférica (< 30 °C), ausência de chuva por pelo menos 24 horas seguintes à aplicação e velocidade do vento (< 11 Km/h). Os caminhos de aplicação do agrotóxico foram predefinidos em uma área correspondente a uma distância de 500 metros em torno do apiário, excluindo um raio de 200 metros em torno do

mesmo, que foi definida como zona tampão (prática comum quando se tem a localização das colônias).

Em relação a avaliação da presença prévia de agrotóxicos nas colônias do presente estudo, amostras de néctar (5 g) e *bee bread* (5 g) foram coletadas individualmente de cada colônia no início da estação (primavera) e no final da temporada apícola (verão/setembro), e enviadas para análise de multiresíduos. Para avaliar eventual acúmulo do inseticida Epik SG<sup>®</sup> nas colônias do apiário em que houve aplicação, amostras de néctar (5 g) e *bee bread* (5 g) foram coletadas antes de aplicação, um e 16 dias após a aplicação (para detecção de efeitos letais e subletais a curto prazo), e enviadas para análise de acetamiprida. Adicionalmente, o néctar foi coletado um dia após a aplicação diretamente das abelhas forrageiras pelo método de capilaridade baseado em Gary e Lorenzen (1976) e o pólen recolhido na entrada das colônias utilizando capta-pólens para análise de resíduos de acetamiprida. As amostras foram congeladas imediatamente após a coleta e enviadas para análises pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada e espectrometria de massa sequencial (LC-MS/MS; Limite de quantificação de 0,01 mg/kg = 10 ppb) no Laboratório Analítico Bioclínico (Espanha). O *residual intake* de acetamiprida nas colônias foi calculado para estimar o pior cenário de contaminação baseado em EFSA (2013).

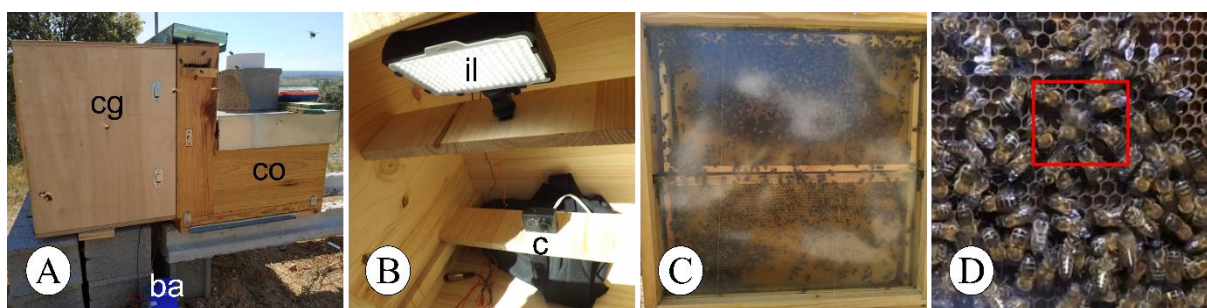
### 3.3.1. Medida de atividade de forrageamento

As distâncias de forragemaneto foram estimadas por meio das análises das danças das abelhas usando uma colônia de observação, que estava em uma caixa tipo *Langstroth* adaptada com vidro (transparente) para visualização de dois quadros. Previamente as gravações, foi instalada uma caixa de madeira (50 x 50 x 40 cm) contendo um iluminador (*Led Pro*, 7.5 w) incidindo luz a 45° graus nos quadros, o qual era carregado por uma bateria (*Ultracell*<sup>®</sup>, 12 volts, 18 Ah), e uma câmera de ação (*Yi action camera*) gravando oito horas de vídeo (9 - 17h) (Figura 12).

As atividades de forrageamento foram avaliadas no apiário com aplicação de acetamiprida (Epik SG<sup>®</sup>) nas cinco datas iniciais, considerando a aplicação e a floração na janela de estudo, seguindo o calendário de monitoramento em campo: 03 e 22 de abril, 11 e 30 de maio e 18 de junho. No total, oito horas de vídeos foram gravados para cada uma das cinco datas. Foram selecionadas 100 danças nos horários de maior atividade de forrageamento (11 às 13h), de cada data, para análise utilizando a metodologia proposta por Couvillon *et al.* (2012) e Schürch *et al.* (2013). A duração das *waggle run* foram avaliadas em milissegundos

utilizando o *software Media Player Classic Home Cinema* (MPC-HC X-64, versão 1.7.13) para correlacionar a relação entre a duração das *waggle run* e a distância de uma fonte de recurso no campo.

**FIGURA 12** - Colônia de observação utilizada para gravar as danças das abelhas. **A** - Colônia de observação com a caixa de gravação instalada. **B** - Sistema de gravação dos vídeos no interior da caixa. **C** - Detalhe do vidro utilizado na colônia para visualizar as danças. **D** - Registro de uma dança de *A. mellifera iberiensis*. **Legenda:** **ba** = bateria automotiva, **c** = câmera, **cg** = caixa de gravação, **co** = colônia de observação, **il** = iluminador led, **quadrado vermelho** = dança de uma abelha em detalhe.



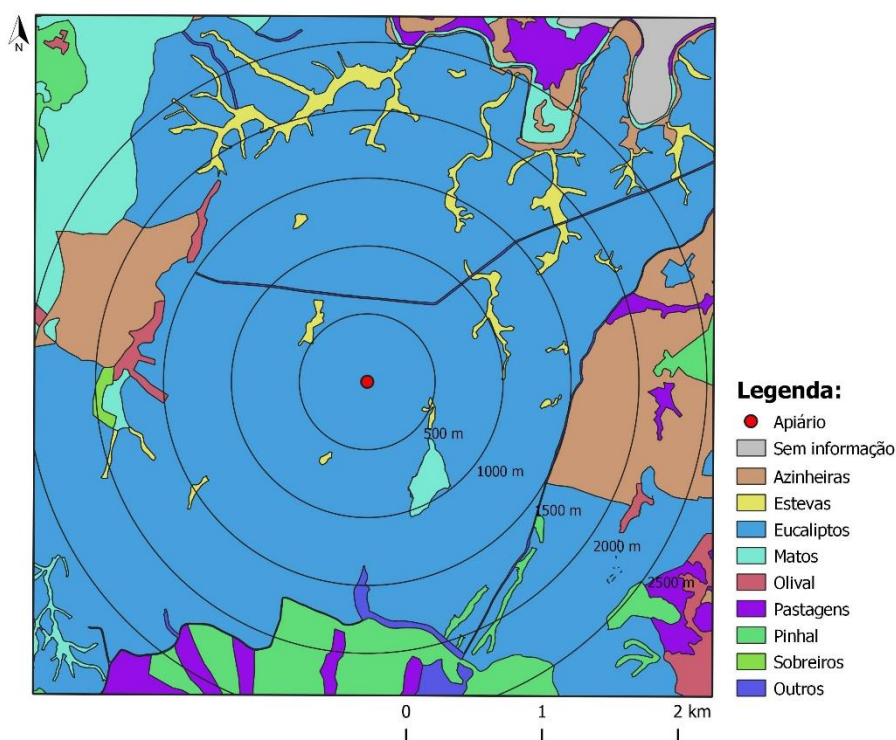
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.4. AVALIAÇÃO DOS RECURSOS FLORAIS

De forma a complementar e correlacionar o item (3.3.1), a disponibilidade de recursos florais existentes também foi avaliada para as mesmas datas na janela do apiário aplicação (5 x 5 Km). Inicialmente, a janela foi mapeada e vetorizada usando uma plataforma de sistema de informação geográfica (SIG), identificando-se os polígonos na paisagem de acordo com os recursos florais existentes predominantes e criando-se assim categorias de paisagem (Figura 13). Em cada ponto de amostragem, a abundância relativa dos recursos foi estimada visualmente nas datas propostas e posteriormente identificadas em nível de espécie. As informações de floração, qualidade e quantidade de recursos e interesse apícola foram obtidas com base na literatura (TALAVERA *et al.*, 1988; SÁENZ LAÍN; FERRERAS, 2000; MENEGUETTI, 2013; AGUADO MARTIN; CASTIEL; SANDOVAL, 2017; FLORA-ON, 2020). Posteriormente a organização destas informações, as espécies foram classificadas de zero a três quanto a sua importância como recurso de néctar e pólen, onde zero representa ausência de recurso e um a três representa baixa, média e alta disponibilidade de recursos respectivamente (GIGAURI, 2019). Após a classificação das espécies, a média da disponibilidade de néctar e pólen foi calculada para cada categoria da paisagem, com base em GigaURI (2019). Diante disso, foi possível criar mapas que permitiram comparar as informações das danças das abelhas com a disponibilidade de recursos em cada data. Os

mapas foram confeccionados utilizando o *software* QGIS 3.4.6-Madeira (QGIS *Development Team*, 2018).

**FIGURA 13** - Variação espacial de recursos florais ao redor do apiário aplicação. A área experimental cobriu uma área quadrada de 5 x 5 Km, com o apiário localizado no centro. Foram identificadas nove categorias de paisagem de acordo com os recursos florísticos dominantes: azinheiras, estevas, eucaliptos, matos, olival, pastagens, pinhal, sobreiros e outros.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os recursos florais, para ambos apiários, foram ainda avaliados por meio da análise palinológica do pólen e do mel. O pólen coletado pelas forrageiras foi recolhido e armazenado nos capta-pólen de madeira com grelha dobrável, instalados em três colônias de estudo de cada apiário, e ativados por um período de 24 horas a cada 19 dias ( $\pm 1$ ) (Figura 14). O mel foi analisado sob a forma de uma amostra composta de três colônias, recolhida após a extração de mel no final do monitoramento. Para realizar a identificação da origem botânica do pólen e do mel, as amostras foram enviadas para análise por especialistas em palinologia do Laboratório Apícola (LabApis) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD).

**FIGURA 14** - Exemplar de um capta pólen sendo ativado em uma colônia de *A. mellifera iberiensis* durante o monitoramento nos locais de estudo.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de distribuição normal (teste de *Shapiro-Wilk* e teste de *Kolmogorov-Smirnov*) e o teste de *Bartlett's* para homogeneidade de variâncias. Os dados referentes ao desenvolvimento das colônias (população adulta, ninho e mortalidade) nos apiários foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA, *two-way*) com medidas repetidas para duas variáveis analisadas (tempo, local). Os resultados foram representados com média  $\pm$  erro padrão e o nível de significância adotado foi de  $P < 0,05$ . O programa estatístico *Statistica*<sup>®</sup> 13.3 (TIBCO, 2017) foi utilizado em todas as análises.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. CONDIÇÕES EXTERNAS E INTERNAS

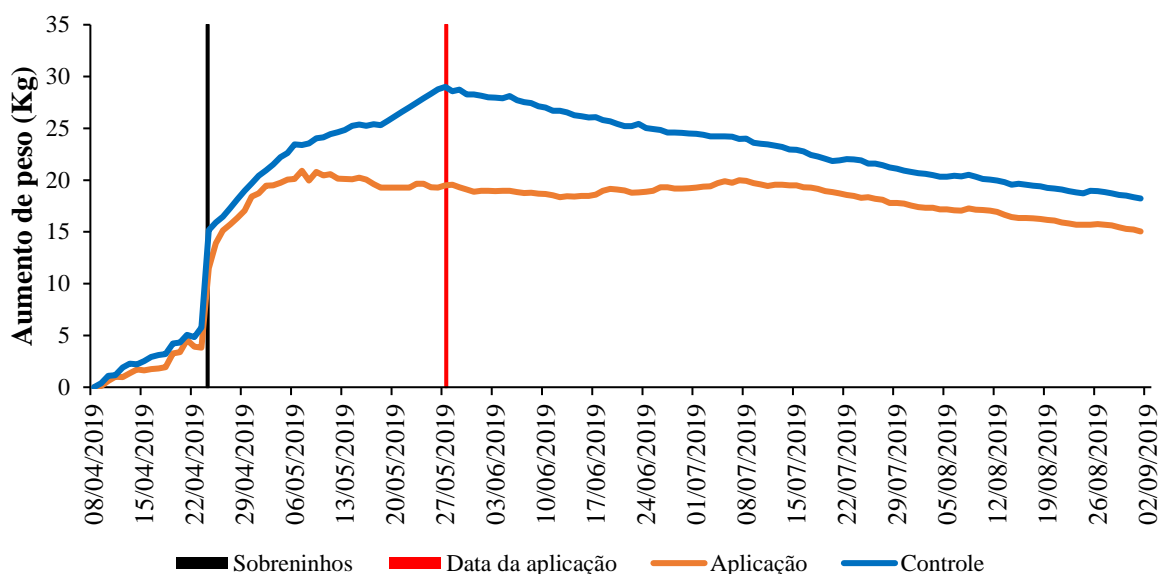
Os parâmetros analisados das condições externas (temperatura, umidade relativa, pluviosidade, radiação solar e velocidade do vento) de ambos os apiários das áreas de estudos selecionadas, registrados por meio das estações meteorológicas, apresentaram valores muito similares durante os seis meses de monitoramento. Os dados compilados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e podem ser observadas no apêndice (1). Em relação aos valores de temperatura e umidade no interior das colônias, registrados pelos sensores presentes nas balanças automáticas, o apiário controle apresentou médias de temperatura de 32 °C ( $\pm 2$ ) e umidade 56,1% ( $\pm 3,4$ ), enquanto o apiário aplicação de 32,6 °C ( $\pm 2$ ) e umidade 58,2% ( $\pm 3$ ).

### 4.2. MONITORAMENTO COM AS BALANÇAS AUTOMÁTICAS

Com base na utilização das balanças automáticas, foi possível acompanhar todo o desenvolvimento das colônias (indicador de produção) e perceber as suas variações ao longo dos meses de monitoramento nos apiários. Após o início de abril, ambos os apiários apresentaram um aumento gradual em quilogramas, sendo que no final de abril (25/04/2019) os sobreninhos, compartimento com quadros adicionais colocados em cima do ninho, foram instalados em ambos os locais. Na sequência da instalação dos sobreninhos, a quantidade de quilograma das colônias (peso) nos apiários aumentou até atingir o pico máximo, no início de maio, para o apiário aplicação e final de maio para o apiário controle (Figura 15). Posteriormente à data da aplicação do Epik SG<sup>®</sup>, as colônias do apiário aplicação se mantiveram com peso constante até exibir um ligeiro aumento no final do mês de junho e início de julho, seguido do decréscimo nas datas seguintes (final do período apícola). Por outro lado, as colônias do apiário controle demonstraram um lento decaimento a partir do início de junho até a data final do monitoramento (Figura 15).



**FIGURA 15** - Monitoramento dos valores em quilogramas das colônias de *A. mellifera iberiensis* de ambos os apiários ao longo do estudo (período apícola em Portugal).

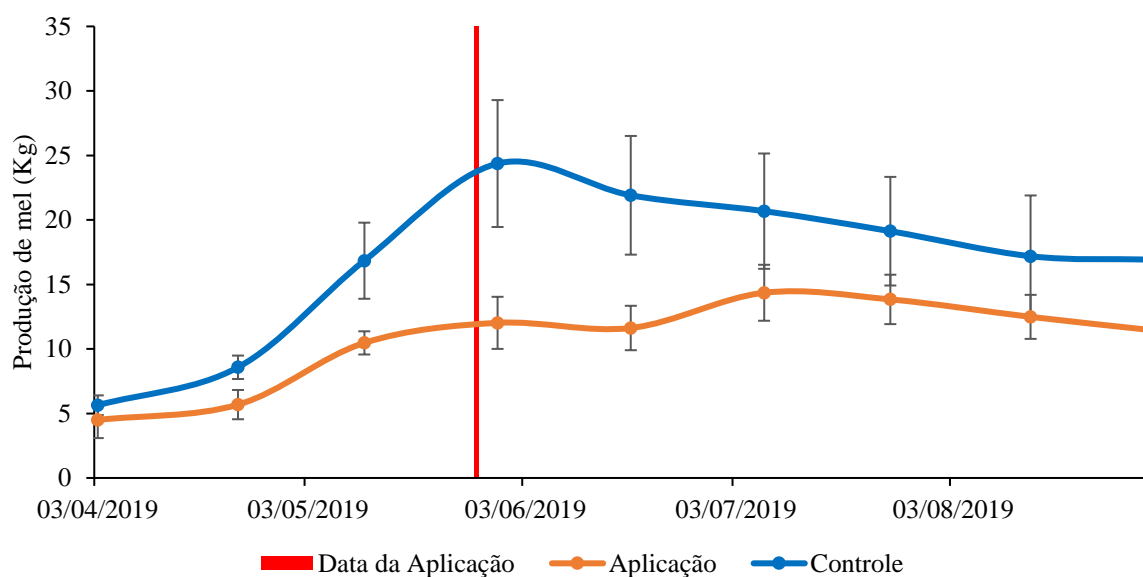


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

#### 4.3. DESENVOLVIMENTO DAS COLÔNIAS

A produção do mel pelas colônias, ao longo do período de monitoramento, demonstrou que as variações do peso observado na figura (15) estão fortemente correlacionadas ( $r = 0,89$ ) com o aumento da quantidade de mel nas colônias, conforme evidenciado na figura (16). Os apiários apresentaram valores máximos da produção de mel em diferentes meses, sendo o apiário controle no final do mês de maio e o apiário aplicação no meio do mês de julho. Embora a produção em quilogramas das colônias do apiário controle seja maior que as colônias do apiário aplicação, a análise dos dados demonstrou que não houve diferença estatística ( $P = 0,066$ ) entre ambos os locais para todas as datas analisadas.

**FIGURA 16** - Quantidade de quilogramas de mel produzido pelas colônias de *A. mellifera iberiensis* de ambos os apiários ao longo dos meses de monitoramento.

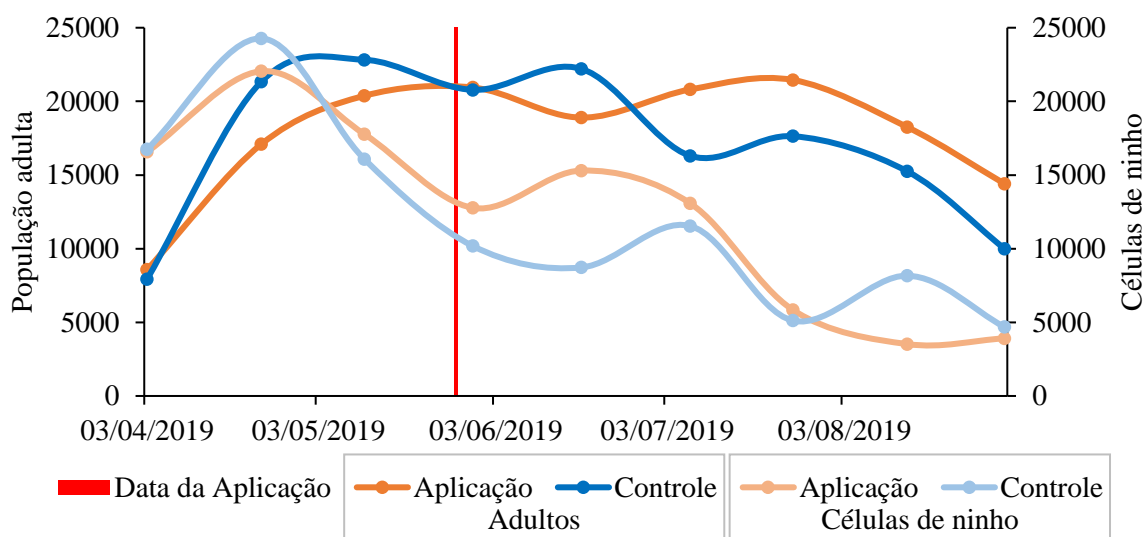


**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A quantidade de indivíduos referentes a população adulta das colônias de ambos os apiários, apresentaram uma evolução de suas populações de forma semelhante, conforme demonstrada na figura (17). O valor mais alto encontrado nas colônias do apiário controle foi observado no meio do mês de maio, enquanto nas colônias do apiário aplicação o valor mais alto registrado aconteceu no final do mês de julho. Não houve diferença estatística ( $P = 0,872$ ) entre as populações adultas das colônias do apiário controle e aplicação em cada uma das datas comparadas, demonstrando similaridade na evolução ao nível populacional no eixo temporal.

Em relação a quantidade de células de ninho das colônias, foram considerados os ovos, as larvas e as crias operculadas. Com base na mesma figura (17), é possível observar que o valor mais alto na quantidade destas células ocorreu ao final do mês de abril para as colônias de ambos os apiários. Após esta data, as colônias de ambos os apiários apresentaram decréscimos com variações, a partir do meio do mês de maio. Não houve diferença estatística ( $P = 0,855$ ) antes e após a aplicação de Epik SG<sup>®</sup> para os apiários em todas as datas.

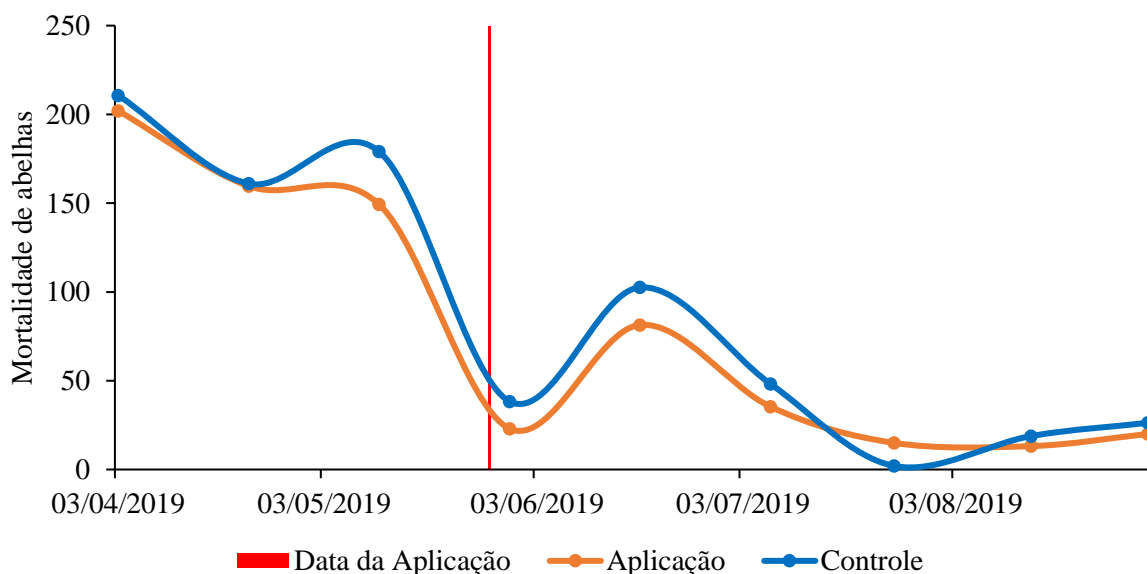
**FIGURA 17** - Média do número de abelhas (população adulta) e do número de células de ninho (ovos, larvas e crias operculadas) das colônias de *A. mellifera iberiensis* em ambos os apiários ao longo dos meses de monitoramento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como último parâmetro do desenvolvimento das colônias, a mortalidade foi contabilizada em cada saída, onde os meses de abril e junho apresentaram maior média de mortalidade enquanto os meses de julho e agosto os menores índices (Figura 18). Considerando todas as datas, a aplicação do Epik SG<sup>®</sup> não afetou estatisticamente ( $P > 0,05$ ) a mortalidade das colônias do apiário aplicação quando comparado com as colônias do apiário controle.

**FIGURA 18** - Média das abelhas mortas das colônias de *A. mellifera iberiensis* em ambos os apiários ao longo dos meses do monitoramento.

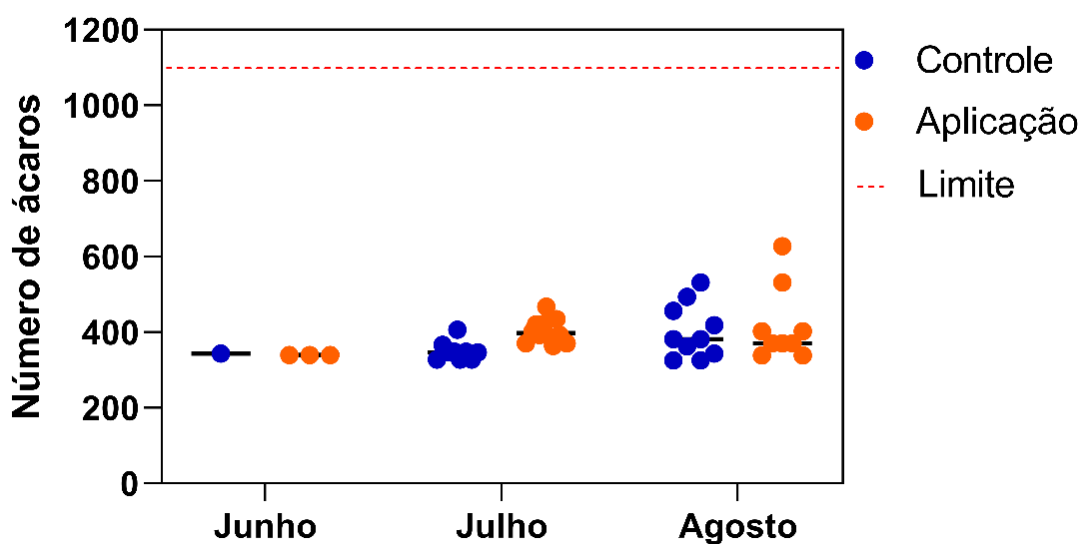


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4. ESTADO SANITÁRIO DAS COLÔNIAS

Durante as inspeções visuais para verificar o estado de saúde das colônias, nenhum dos sintomas prejudiciais descritos no item (3.2.3.) foram detectados nas colônias de ambos os apiários do presente estudo. As abelhas, em fase larval e adulta, demonstraram aparência visualmente saudável e comportamentos padrões conforme a lista de comportamentos normais descrita por Scheiner *et al.* (2013). No que se refere a detecção e quantificação do ácaro *V. destructor*, a figura 19 evidencia que apenas nos meses de junho, julho e agosto foram registrados a presença do ácaro. Entretanto, os valores para esses meses estão muito distantes do limite que as colônias suportam (próximos de 1200 ácaros).

**FIGURA 19** - Quantidade de ácaros *V. destructor* e meses em que foram detectados nas colônias de *A. mellifera iberiensis* dos dois apiários.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DE MULTIRESÍDUOS E DE ACETAMIPRIDA

As análises de multiresíduos para as matrizes de néctar e *bee bread* das colônias, coletados no início da primavera (03/04/2019) e no final do período apícola (03/09/2019), detectaram a presença de duas moléculas tóxicas (Tabela 1). O acaricida coumafos foi encontrado em colônias dos dois apiários no início e no final, sendo o valor residual máximo encontrado de 0,051 mg/kg - ppm no néctar de uma colônia do apiário controle. Entretanto, o inseticida acetamiprida foi detectado somente no final do estudo em uma colônia do apiário

aplicação, na concentração de 0,017 mg/kg - ppm no *bee bread*. É relevante ressaltar que não foi detectada a presença de resíduo de acetamiprida em nenhuma das amostras antes da data de aplicação.

**TABELA 1** - Análise de multiresíduos (476 resíduos analisados por MR GC-MS/MS e MR UPLC-MS/MS) de amostras de néctar e *bee bread* coletados no início e no final da temporada apícola. As amostras não presentes nesta tabela, não possuem resíduos acima do limite de detecção (0,01 mg/kg s.a.).

Local	Colônia	Data da coleta	Matriz	Resíduos (mg/kg = 1ppm)
Controle	1	03/04/2019	<i>Bee bread</i>	Coumafos* - 0,023
Controle	1	03/04/2019	Néctar	Coumafos* - 0,051
Controle	2	03/04/2019	<i>Bee bread</i>	Coumafos* - 0,013
Aplicação	5	03/09/2019	<i>Bee bread</i>	Coumafos* - 0,010; Acetamiprida - 0,017

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As análises para a identificação da presença de resíduos de acetamiprida no néctar e no *bee bread* demonstraram-se negativas antes da aplicação e positivas um e 16 dias após aplicação, apenas para o *bee bread*. O inseticida foi encontrado em três colônias um dia após a aplicação, com a detecção máxima de 0,023 mg/kg - ppm e em quatro colônias 16 dias após a aplicação, com a detecção máxima de 0,042 mg/kg - ppm conforme compilado na tabela (2).

**TABELA 2** - Análise residual de acetamiprida (analisado usando MR GC-MS/MS com um limite de detecção de 0,01 mg/kg) das amostras de néctar e *bee bread* coletadas nos dias 26 de maio (antes da aplicação), 28 de maio (um dia após a aplicação) e 12 de junho (16 dias após a aplicação), em todas as colônias (apiário controle e aplicação). As amostras não presentes nesta tabela, não possuem resíduos de acetamiprida acima do limite de detecção (0,01 mg/kg s.a.).

Local	Colônia	Data da coleta	Matriz	Acetamiprida (mg/kg = 1ppm)
Aplicação	2	28/05/2019	<i>Bee bread</i>	0,019
Aplicação	4	28/05/2019	<i>Bee bread</i>	0,023
Aplicação	5	28/05/2019	<i>Bee bread</i>	0,020
Aplicação	2	12/06/2019	<i>Bee bread</i>	0,024
Aplicação	3	12/06/2019	<i>Bee bread</i>	0,020
Aplicação	4	12/06/2019	<i>Bee bread</i>	0,014
Aplicação	5	12/06/2019	<i>Bee bread</i>	0,042

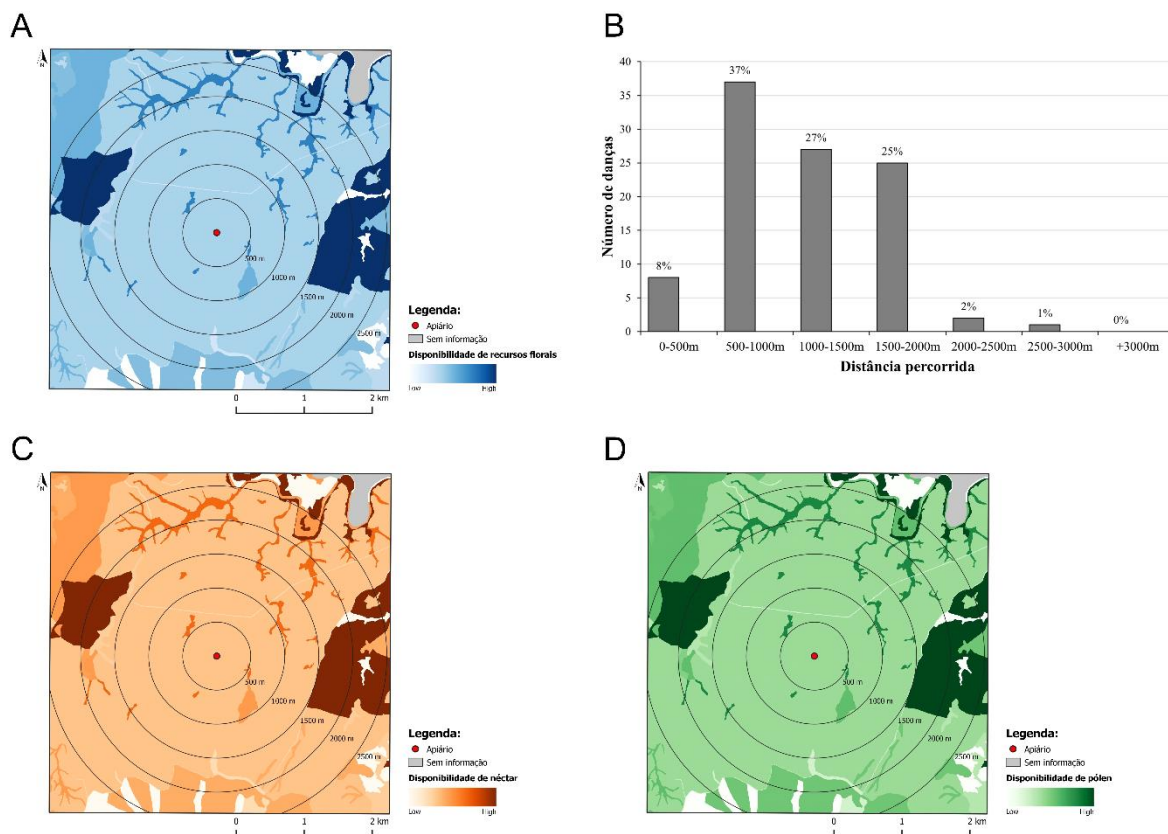
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Em relação as amostras de pólen, coletadas por intermédio dos capta-pólen, e néctar fresco, proveniente do papo das abelhas, somente no pólen do apiário aplicação foi detectada a presença do inseticida acetamiprida na concentração de  $0,096 \pm 0,048$  mg/Kg s.a., um dia após a aplicação de Epik SG<sup>®</sup>. Em virtude dos resíduos de acetamiprida estarem presentes apenas nas amostras de pólen e *bee bread*, a taxa de *intake* foi calculada para larvas e adultas (*nurses*) utilizando o valor máximo de acetamiprida detectado 0,144 mg/Kg (pólen), porque estas são as classes de abelhas que mais se alimentam de pólen ao longo do seu ciclo/função. Não consideramos as *foragers* e as *winter bees*, uma vez que o consumo não é relevante (EFSA, 2013). Levando em consideração o consumo de 2 mg de pólen no período de alimentação das larvas (cinco dias), a ingestão total de acetamiprida é 0,288 ng. Para os adultos, o consumo diário considerado de pólen é 12 mg (durante 10 dias) o que pressupõe uma ingestão máxima de 17,28 ng no período (1,728 ng dia x 10 dias).

#### 4.6. FORRAGEAMENTO E RECURSOS FLORAIS

A decodificação das danças das abelhas, como forma de estimar as distâncias percorridas pelas abelhas, associada a disponibilidade de recursos, podem ser observadas nas figuras (20-24) para as cinco datas descritas no item (3.3.1). Com base nas diferentes datas analisadas, é possível evidenciar que as três primeiras são as que possuem maior disponibilidade de recursos no raio de 2,5 Km ao redor das colônias (Figuras 20-22). A figura 20 destaca a primeira data do monitoramento, realizada em 03/04/2019, onde é possível observar elevada disponibilidade de recursos nas faixas de 500 até 2500 metros (Figuras 20A, 20C-D). A maior porcentagem de forrageamento das danças analisadas aconteceu na faixa de 500-1000 metros com 37%, seguido de 1000-1500 metros com 27% e 1500-2000 metros com 25% (Figura 20B). As demais faixas não ultrapassaram 8% das danças analisadas.

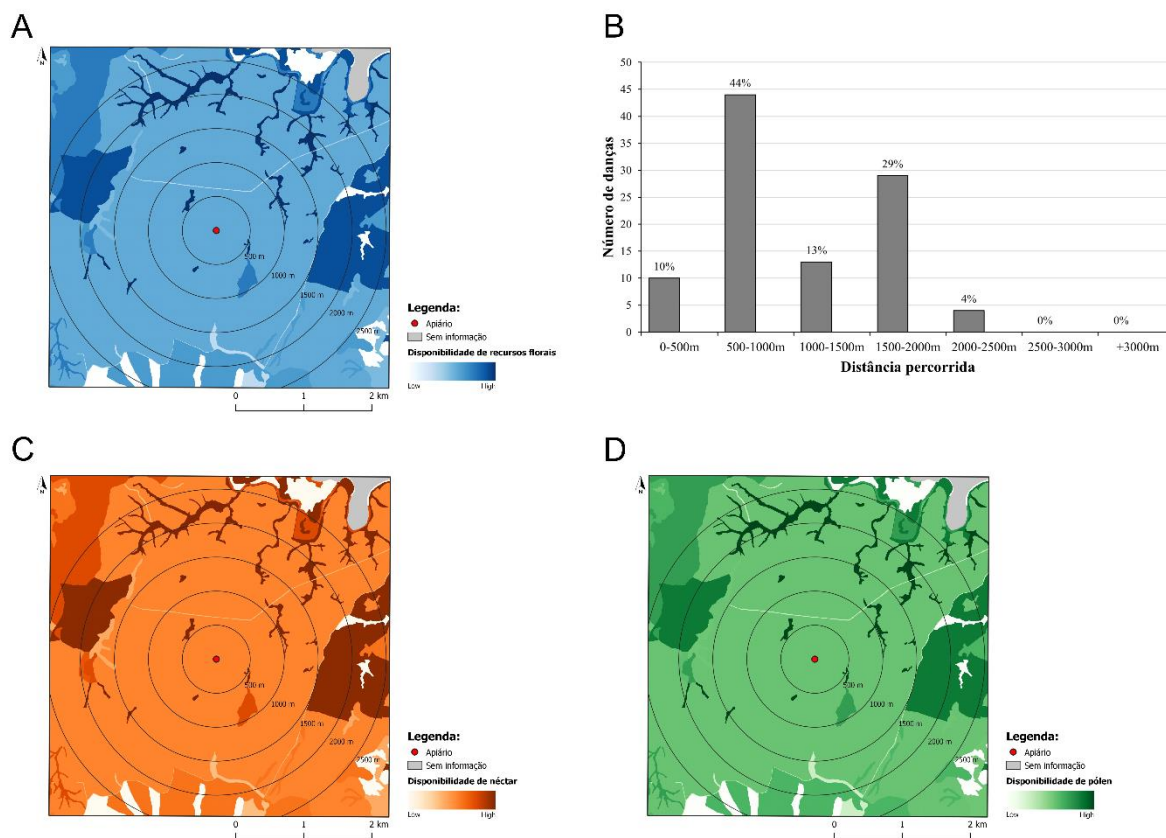
**FIGURA 20** - Disponibilidade de recursos e decodificação das danças realizadas pelas abelhas *A. mellifera iberiensis* da colônia de observação do apiário aplicação em 03/04/2019. **A** - Disponibilidade de recursos florais (néctar + pólen). **B** - Distâncias de forrageamento percorrida pelas abelhas. **C** - Disponibilidade de néctar. **D** - Disponibilidade de pólen.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Na data seguinte de abril, 22/04/2019, podemos destacar alta disponibilidade de recursos nas faixas de 500-1000 metros, 1500-2000 metros e 2000-2500 metros (Figuras 21A, 21C-D). As danças analisadas destacaram que 44% do forrageamento aconteceu na faixa de 500-1000 metros, seguido de 1500-2000 com 29%, 1000-1500 metros com 13%, 0-500 metros com 10% (Figura 21B). As demais faixas não ultrapassaram 5% das danças analisadas.

**FIGURA 21** - Disponibilidade de recursos e decodificação das danças realizadas pelas abelhas *A. mellifera iberiensis* da colônia de observação do apiário aplicação em 22/04/2019. **A** - Disponibilidade de recursos florais (néctar + pólen). **B** - Distâncias de forrageamento percorrida pelas abelhas. **C** - Disponibilidade de néctar. **D** - Disponibilidade de pólen.

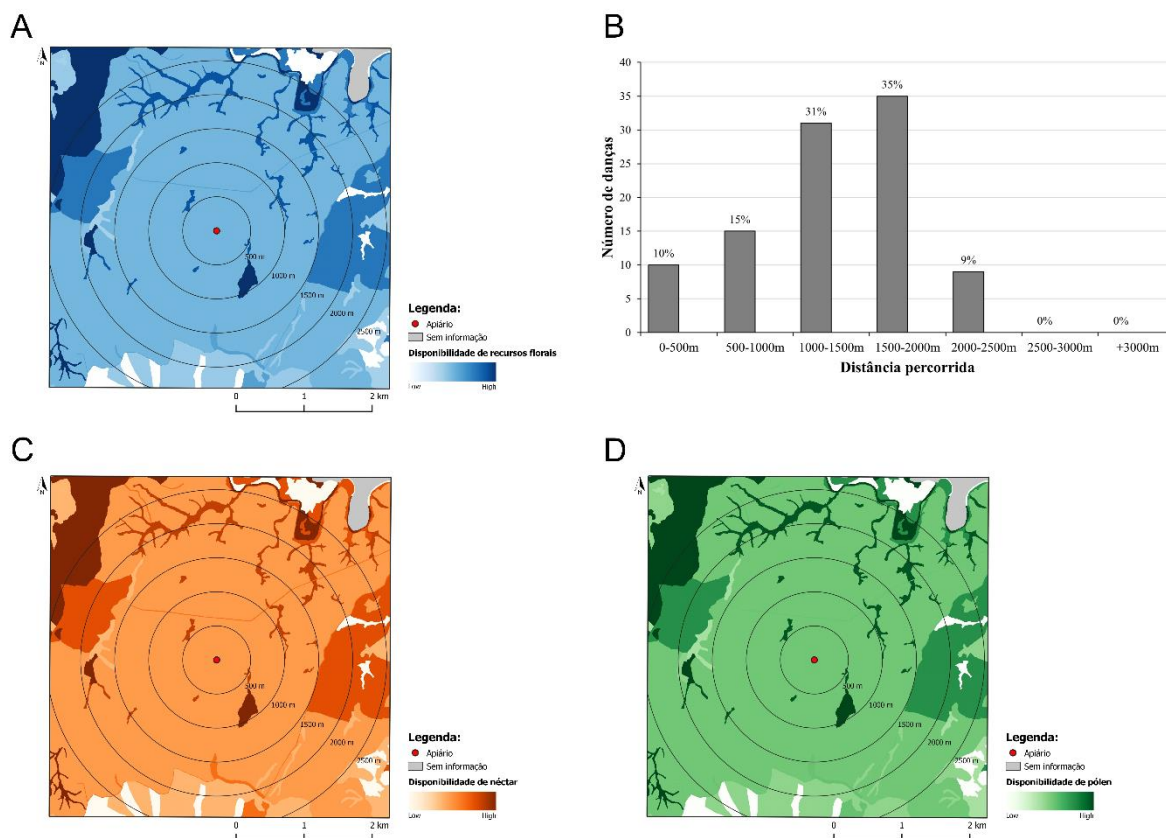


Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura (22), 11/05/2019, demonstra maior disponibilidade de recursos nas faixas de 500-1000 metros, 1500-2000 metros e 2000-2500 metros (Figuras 22A, 22C-D). As danças analisadas evidenciaram que 35% do forrageamento foi na faixa de 1500-2000 metros, seguido de 1000-1500 com 31%, 500-1000 metros com 15%, 0-500 metros com 10% e 2000-2500 metros com 9% (Figura 22B). As demais faixas não registraram atividade de forrageamento pelas danças analisadas.



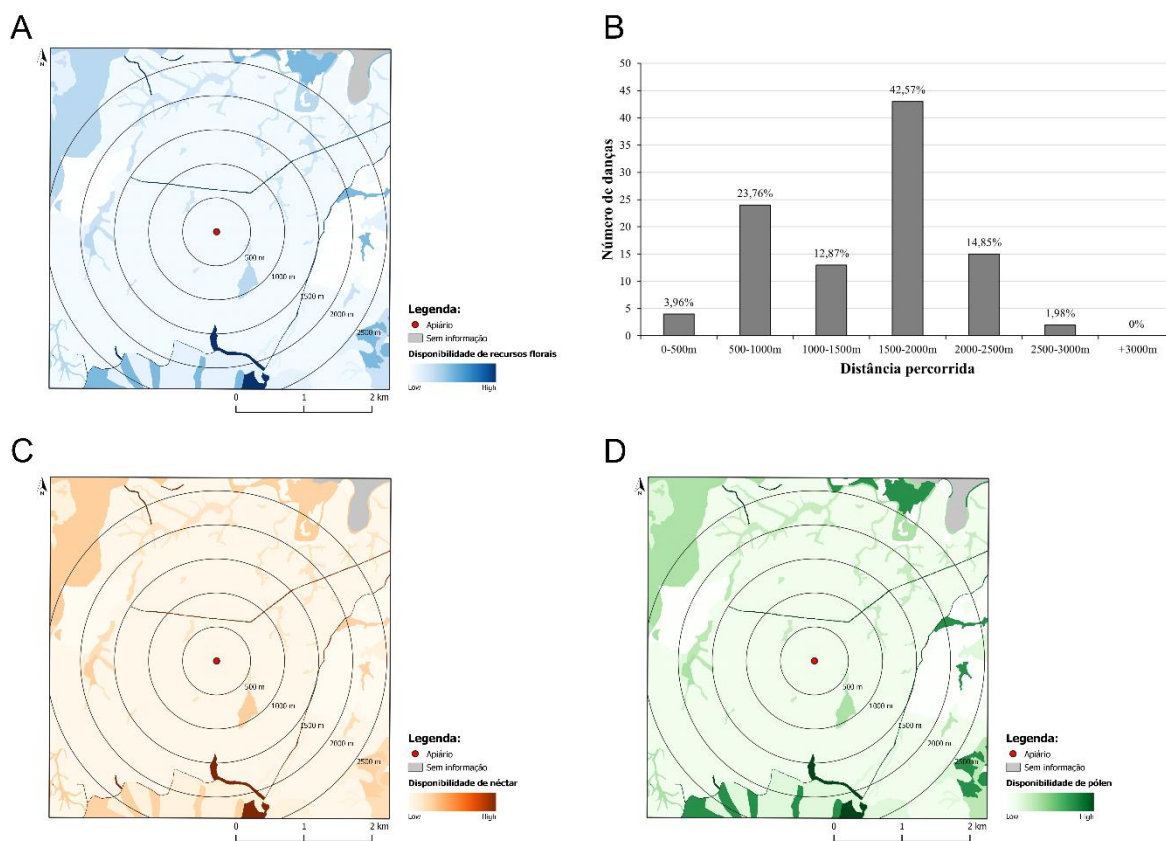
**FIGURA 22** - Disponibilidade de recursos e decodificação das danças realizadas pelas abelhas *A. mellifera iberiensis* da colônia de observação do apiário aplicação em 11/05/2019. **A** - Disponibilidade de recursos florais (néctar + pólen). **B** - Distâncias de forrageamento percorrida pelas abelhas. **C** - Disponibilidade de néctar. **D** - Disponibilidade de pólen.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A data de 30/05/2019, destaca os recursos e as atividades de forrageamento das abelhas três dias após a aplicação do Epik SG<sup>®</sup>, como pode ser observada na figura (23). A disponibilidade de recursos estava baixa próximo das colônias, sendo 1500-200 metros a faixa com maior quantidade de recursos (Figuras 23A, 23C-D). É possível destacar que a maior porcentagem de forrageamento foi na faixa de 1500-2000 metros com 42,57% das danças analisadas, seguido de 500-1000 metros com 23,76%, 2000-2500 metros com 14,85% e 1000-1500 metros com 12,87%. Apenas 3,96% das danças indicaram que as abelhas forragearam entre 0-500 metros, entrando em contato com a zona de aplicação do Epik SG<sup>®</sup> (Figura 23B). Não houve forrageamento em distâncias superiores aos 3000m.

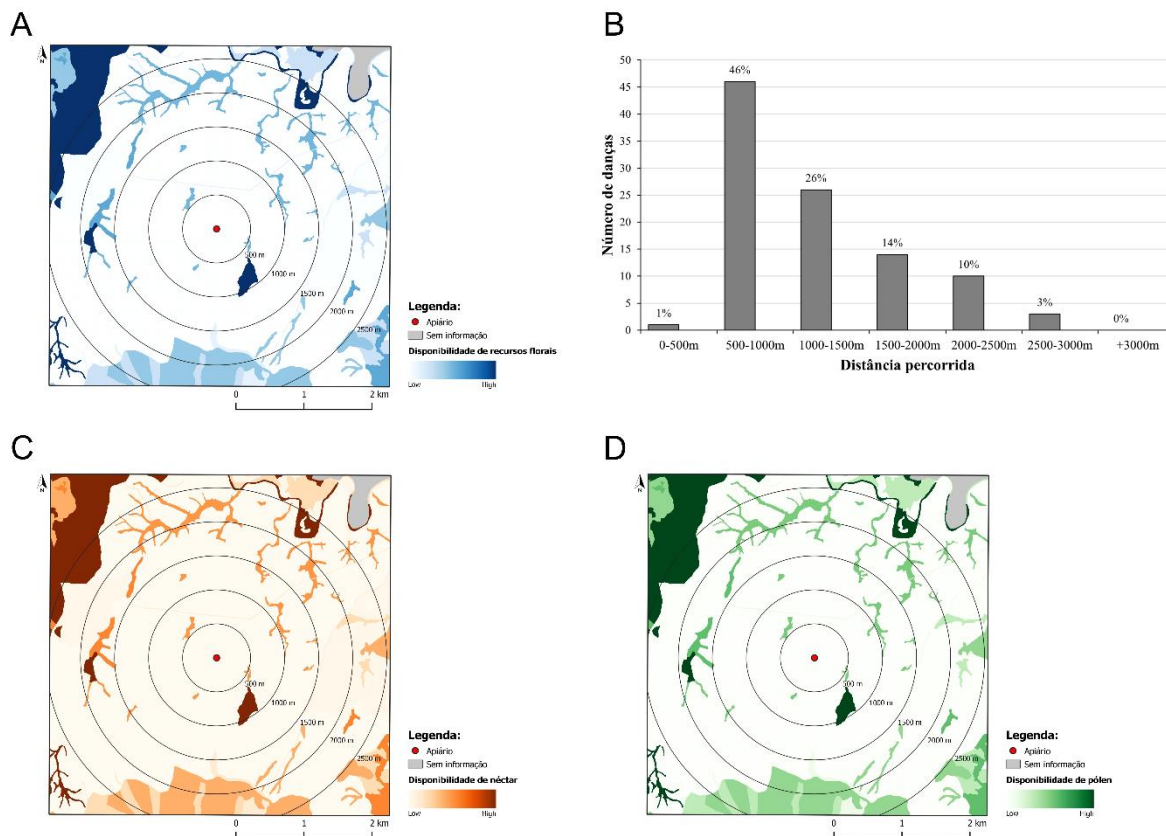
**FIGURA 23** - Disponibilidade de recursos e decodificação das danças realizadas pelas abelhas *A. mellifera iberiensis* da colônia de observação do apiário aplicação em 30/05/2019, três dias após aplicação de acetamiprida (Epik SG®). **A** - Disponibilidade de recursos florais (néctar + pólen). **B** - Distâncias de forrageamento percorrida pelas abelhas. **C** - Disponibilidade de néctar. **D** - Disponibilidade de pólen.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação a última data, 18/06/2019, a maior quantidade de recursos estava nas faixas de 500-1000 metros (Figuras 24A, 24C-D). Da mesma forma, as atividades de forrageamento foram maiores nas faixas de 500-1000 metros com 45% das danças analisadas, seguido de 1000-1500 metros com 26%, 1500-2000 com 14% e 2000-2500 metros com 10% (Figura 24B). As demais faixas de forrageamento não ultrapassaram 3% das danças analisadas.

**FIGURA 24** - Disponibilidade de recursos e decodificação das danças realizadas pelas abelhas *A. mellifera iberiensis* da colônia de observação do apiário aplicação em 18/06/2019. **A** - Disponibilidade de recursos florais (néctar + pólen). **B** - Distâncias de forrageamento percorrida pelas abelhas. **C** - Disponibilidade de néctar. **D** - Disponibilidade de pólen.

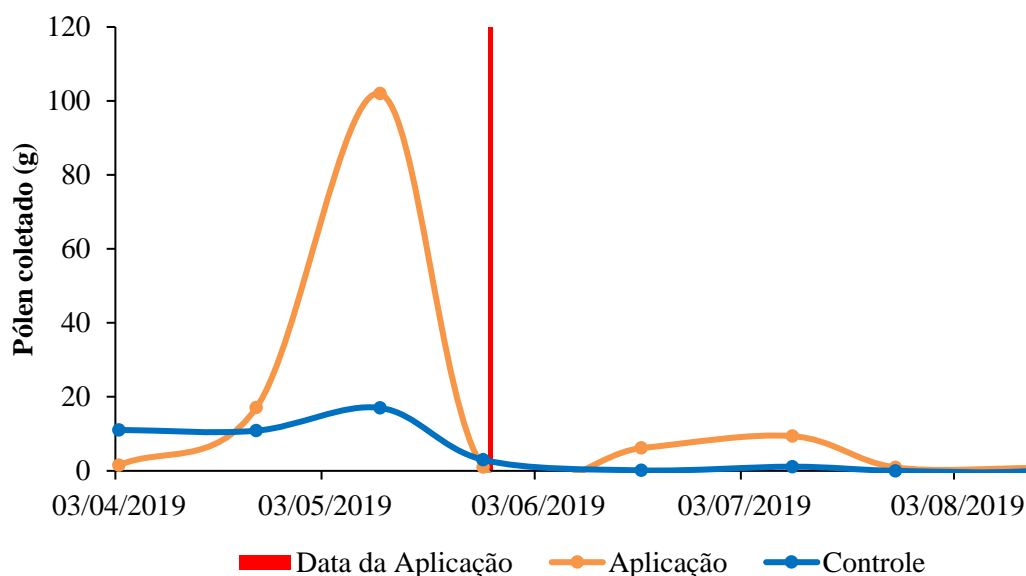


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.7. ANÁLISE PALINOLÓGICA DO PÓLEN E MEL COLETADOS

Os dados da quantidade de pólen (em gramas) das colônias nos dois apiários, permitiram identificar as datas onde esse recurso foi mais coletado. A figura (25) exibe comparativamente a evolução do recurso nas colônias antes e após a aplicação, sendo que ambos os locais apresentaram maior pico de coleta na metade do mês de maio, ou seja, pré-aplicação de Epik SG®. É possível observar que, a quantidade de recurso coletado pelas colônias um dia antes da aplicação (26/05/2019) foi baixa, assim como após à aplicação em ambos os apiários.

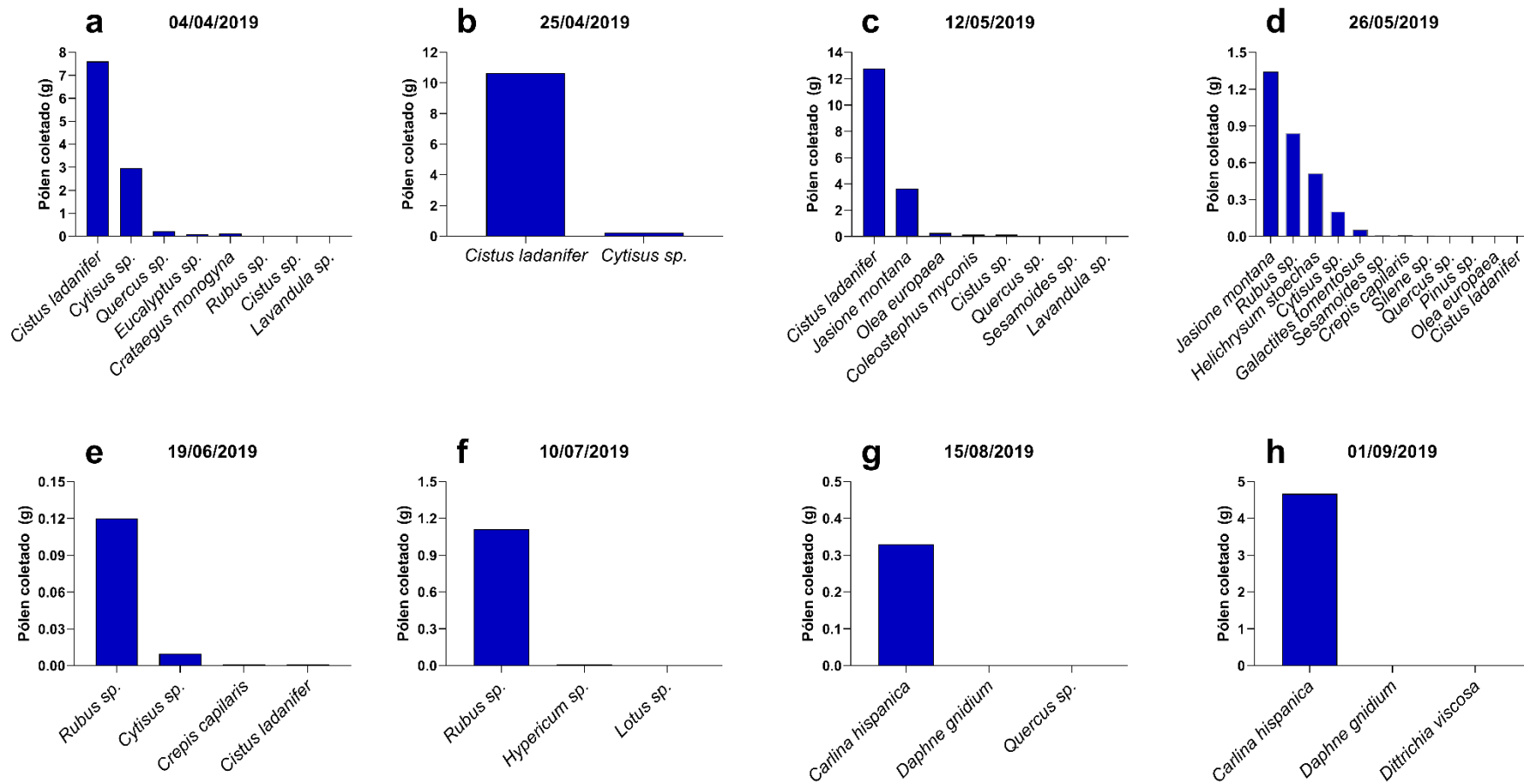
**FIGURA 25** - Quantidade de pólen coletado (gramas) pelas colônias de *A. mellifera iberiensis* de ambos os apiários ao longo do monitoramento.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

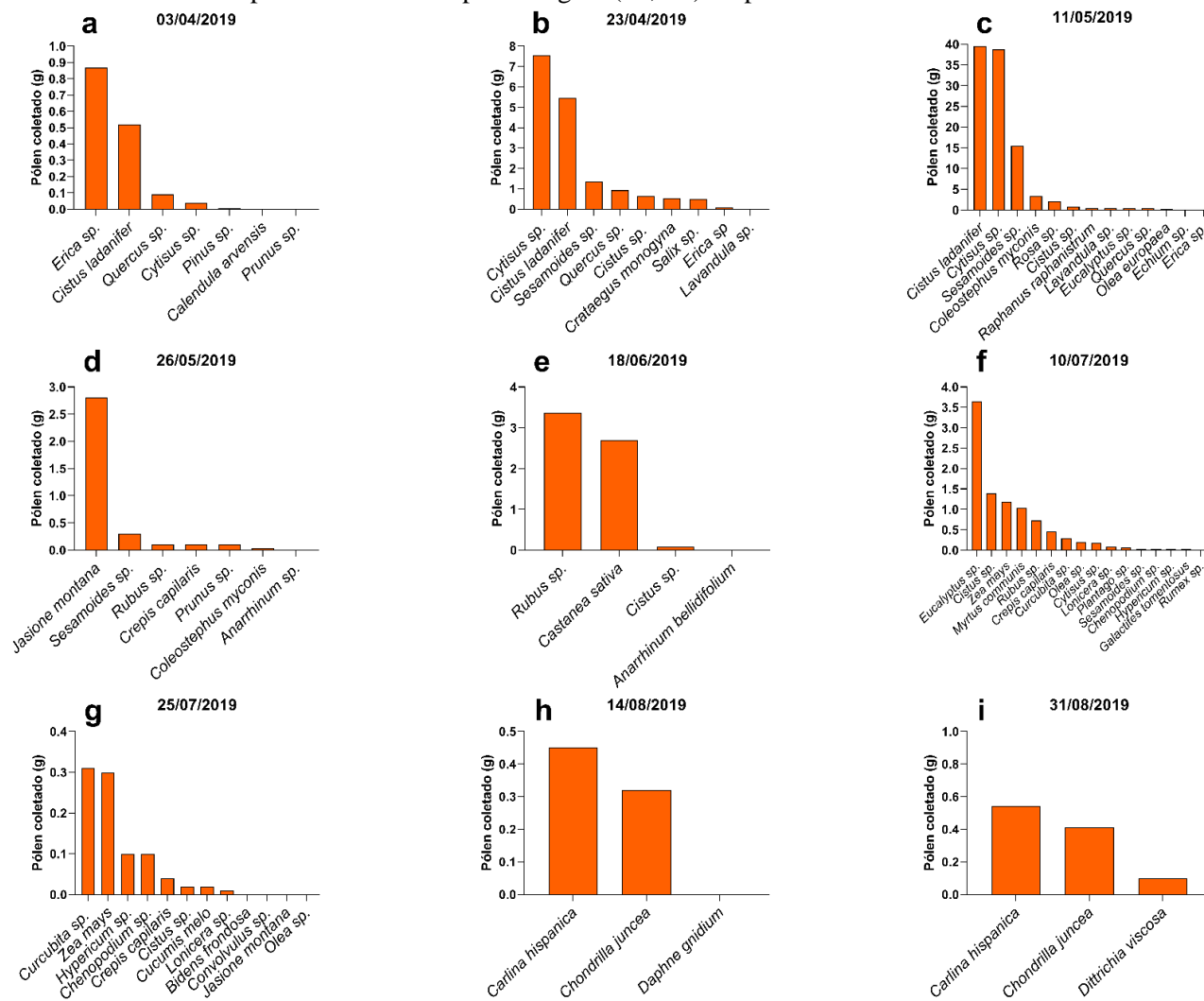
As amostras de pólen enviadas para identificação botânica das espécies demonstraram uma grande diversidade nos dois apiários (Figuras 26 e 27), sendo 22 espécies no apiário controle e 41 espécies no apiário aplicação, entretanto, algumas espécies foram mais relevantes no que se refere a quantidade coletada em gramas. No apiário controle, predominantemente, duas espécies se destacaram nas três primeiras datas (Figura 26a-c), *Cistus ladanifer* e *Cytisus sp.* Nas datas seguintes (Figura 26d-g), pólen de diferentes espécies foram coletados em quantidades inferiores aos primeiros dois meses. Na última coleta (Figura 26h), a quantidade de pólen aumentou e apresentou predominância da espécie *Carlina hispânica*. De maneira similar ao apiário controle, duas espécies se destacaram no apiário aplicação (Figura 27c), *Cistus ladanifer* e *Cytisus sp.* no período em que o valor máximo de pólen foi registrado. Nas datas seguintes (Figura 27d-i), diferentes espécies foram registradas embora em quantidades inferiores as coletas de 23/04/2019 e 11/05/2019.

**FIGURA 26** - Análise palinológica e quantidade de pólen coletado em cada uma das datas de monitoramento no apiário controle. \*As quantidades registradas no final de abril e início de maio representam a maior porcentagem (81,3%) do pólen total coletado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

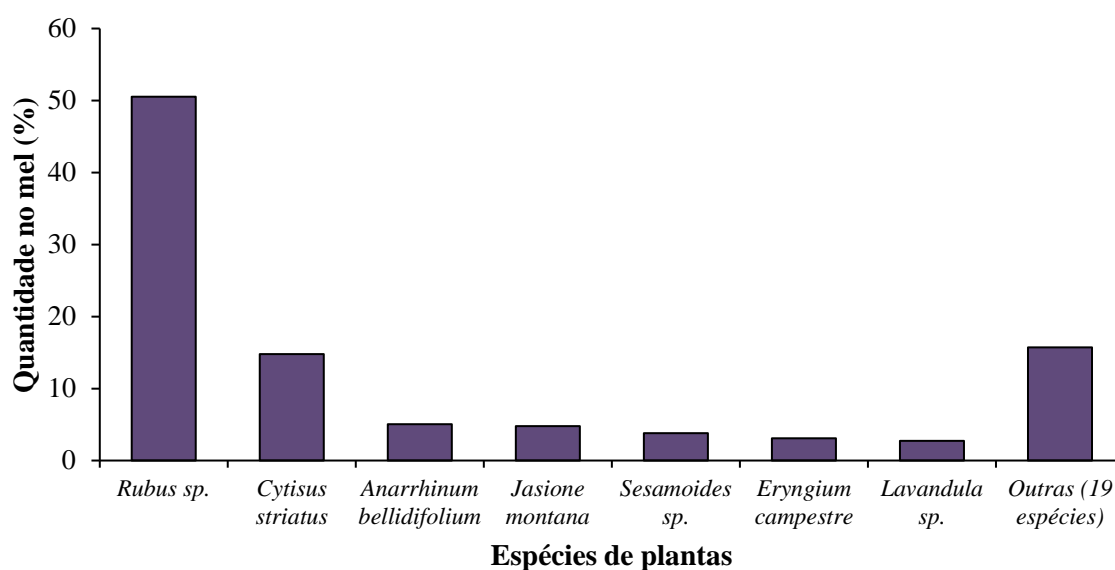
**FIGURA 27** - Análise palinológica e quantidade de pólen coletado em cada uma das datas de monitoramento no apiário aplicação. \*As quantidades registradas no final de abril e início de maio representam a maior porcentagem (85,2%) do pólen total coletado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados da origem botânica do pólen presente na amostra composta do mel revelaram a presença de 26 espécies diferentes. Dentre todas estas espécies presentes no mel, *Rubus sp.* representou 50,53% da amostra e foi o recurso mais utilizado como fonte de néctar pelas colônias dos dois apiários seguido de *Cytisus striatus* com 14,77% e *Anarrhinum bellidifolium* com 5,05% (Figura 28). As demais espécies não atingiram, individualmente, 5% da amostra.

**FIGURA 28** - Análise palinológica da amostra composta do mel de *A. mellifera iberiensis* em ambos os apiários do estudo. \*19 espécies apresentaram percentagem inferior a 1% e por isso foram agrupadas em outras.



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

Embora o inseticida acetamiprida seja considerado menos tóxico que outros inseticidas neonicotinóides, é importante ressaltar que inúmeros estudos conduzidos em laboratório destacam seus efeitos adversos, isolado ou associado a outros agrotóxicos, ao nível individual em larvas e adultos de abelhas melíferas (HAN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020a; SHI *et al.*, 2020b; WANG; ZHU; LI, 2020). Contudo, ainda se faz necessário estudos em campo para averiguar os efeitos de concentrações realísticas nas colônias em diferentes paisagens (ALBURAKI *et al.*, 2017; ALBURAKI *et al.*, 2018). Desta forma, o presente estudo é inovador em relação os efeitos da aplicação do acetamiprida em um cenário realístico, como em áreas de cultivo do eucalipto.

Nesse sentido, as abelhas podem entrar em contato com os agrotóxicos por diferentes vias, seja no momento do voo de forrageamento (SPONSLER; JOHNSON, 2017), na coleta de recursos florais contendo resíduos (PETTIS *et al.*, 2013; BOHME *et al.*, 2018) ou no interior da colônia, afetando o desenvolvimento de larvas e conseqüentemente a manutenção da saúde e sobrevivência da colônia (SILVA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015; FRIOL *et al.*, 2017). Diante desse cenário, é importante ressaltar que os parâmetros utilizados para o monitoramento podem fornecer informações fidedignas do desenvolvimento das colônias e, conseqüentemente contribuir para diminuição do risco de exposição em um período de aplicação de agrotóxico em áreas manejadas, ou seja, uma ferramenta de apoio à decisão no que diz respeito às práticas apícolas.

Os dados constantes registrados pelas balanças automáticas associados aos resultados da produção de mel, evidenciaram as melhores épocas de produção/floração em ambos os locais. Nesse contexto, uma aplicação realizada no momento de maior disponibilidade destes recursos poderia levar à maior presença de resíduos de acetamiprida no pólen e no néctar, o que eventualmente pode prejudicar a saúde e a performance das abelhas forrageiras e posteriormente as *winter bees*, uma vez que são as que consomem mais alimento conforme descrito por Seeley e Visscher (1985). Por outro lado, segundo Urbanowicz *et al.* (2019) a aplicação de agrotóxico em um cenário de floração não necessariamente pode levar a um aumento da exposição, especialmente se houver disponibilidade de recursos sem resíduos próximos da colônia. Entretanto, a aplicação de agrotóxico em um cenário com produção estabilizada e com baixa disponibilidade de recursos, tende a diminuir o risco de exposição das abelhas.



Os resultados da população das colônias (células de ninho e adultos) e mortalidade, evidenciadas ao longo do eixo temporal do monitoramento, indicam que a aplicação pontual de Epik SG<sup>®</sup> não afetou estes parâmetros das colônias do apiário aplicação. Dentre os fatores que influenciam a população e a mortalidade das abelhas, podemos destacar a disponibilidade de recursos e alterações sazonais (LEMANSKI; BANSAL; FEFFERMAN, 2020), doenças e parasitas, agrotóxicos e distúrbios no habitat (SWITANEK *et al.*, 2017; REQUIER, 2019). Nesse sentido, como as condições externas de ambos os apiários apresentaram valores constantemente similares (apêndice 1) com ausência de distúrbios em ambos os locais e a disponibilidade de recursos foi maior no apiário aplicação, os dados gerados neste trabalho estão alinhados com a literatura.

A atividade de forrageamento das abelhas permite a coleta de pólen, néctar, água e outros recursos essenciais (resinas, extratos florais, material para o ninho), que são extremamente importantes para o desenvolvimento da colônia (HILÁRIO; IMPERATRIZ-FONSECA; KLEINERT, 2000). O fato de existir pouca atividade de forrageamento no raio de 0-500 metros, três dias após aplicação e ao longo das demais datas, indica a baixa disponibilidade de recurso nessa área e é uma explicação para os valores residuais de acetamiprida encontrados no interior das colônias. Segundo Abou-Shaara (2014), as características da paisagem, a disponibilidade de recursos para o forrageamento e a saúde das abelhas representam um papel importante nas faixas dessa atividade, que podem ser muito variáveis. A maioria dos eucaliptos utilizados nos sistemas intensivos em Portugal são híbridos ou não atingem o período de floração (VALENTE; MACHADO; SILVA, 2008). Dessa forma, o recurso proveniente destas plantações é pouco utilizado, sendo a vegetação arbustiva e subarbustiva a maior fonte de néctar e pólen para as colônias localizadas nesse sistema.

As análises de resíduos nos indicaram que as fontes de pólen demonstraram ser o principal foco de exposição ao acetamiprida para as colônias devido a presença de resíduos ( $0,096 \pm 0,048$  mg/kg s.a) e eventual acumulação no *bee bread*. O pólen, na qual é convertido bioquimicamente e por ação microbiana em *bee bread*, tem maior afinidade para certas moléculas dos agrotóxicos devido à presença de lipídios (MORALES *et al.*, 2020). Alguns agrotóxicos são lipofílicos (acetamiprida é ligeiramente lipofílica; coeficiente de partição = 0,8), o que significa que tem alguma afinidade a lipídios. Sendo assim, a maioria dos resíduos são comumente encontrados em amostras de pólen (MULLIN *et al.*, 2010; ROSZKO *et al.*, 2016), na qual atuam como um bioindicar de contaminação ambiental (NIELL *et al.*, 2018).

Em relação ao néctar, as análises não detectaram a presença de resíduos de acetamiprida, mesmo no néctar fresco que foi coletado diretamente das forrageiras, o que pode ser um indicativo que não houve contaminação do substrato arbustivo que estava em floração no momento da aplicação ou que esses níveis eram baixos e passíveis de desintoxicação pelas abelhas, não sendo detectados nas análises (limite de detecção = 0,01 mg/Kg). Entretanto, mesmo que o néctar coletado das flores contenha resíduos de acetamiprida, é mais difícil encontrar resíduos no mel, uma vez que durante o processo de trofalaxia até a fermentação, resíduos podem ser eliminados devido à presença de enzimas ligadas ao sistema imunitário e à desintoxicação nos tecidos dos órgãos onde o néctar é processado (VANNETTE; MOHAMED; JOHNSON, 2015). Brunet, Badiou e Belzunces (2012) destacaram que após exposição oral a uma concentração residual de acetamiprida, mais de 50% do composto foi metabolizado em menos de 30 minutos, indicando um curto tempo de meia-vida. Entretanto, isso não invalida que as abelhas possam acumular resíduos no seu corpo, dependendo do nível de contaminação do alimento e consequente exposição dos indivíduos (EFSA, 2013).

Avaliando a exposição das diferentes classes de abelhas, as forrageiras estão potencialmente mais expostas aos agrotóxicos por contato ou ingestão (WILLIAMSON; WILLIS; WRIGHT, 2014; SAMARGHANDI *et al.*, 2017). No entanto, estas abelhas possuem menos corpo gorduroso (CRUZ-LANDIM, 2009), o que pode representar menor acumulação. Por outro lado, mais de metade do corpo das *nurse bees* e cerca de 60% do corpo das larvas é composto pelo corpo gorduroso, sendo que ambas são alimentadas com *bee bread* (BISHOP, 1961). As *nurse bees* se alimentam de *bee bread* até ao décimo dia, o que promove o desenvolvimento das glândulas hipofaríngeas e mandibulares, permitindo produzir geleia real para alimentar as larvas (LI *et al.*, 2010). De acordo com Rortais *et al.* (2005), estas abelhas alimentam-se de 65 mg de pólen durante esses 10 dias.

Considerando o pior cenário de exposição, as *nurses bees* consumiriam 17,28 ng de acetamiprida ao final de 10 dias. Segundo o relatório de avaliação para o acetamiprida (EFSA, 2013), testes crônicos conduzidos com *A. mellifera* destacam a CL<sub>50</sub> (10 dias) de 11,7 µg s.a. abelha/dia e assumindo uma proporção linear, atingiria um total de 117 µg/abelha ao final dos 10 dias. Este valor é 18.750 vezes superior ao valor que as colônias do apiário aplicação estiveram expostas, o que nos indica fortemente que a exposição das colônias foi mínima/residual para causar algum efeito passível de ser detectado a nível colonial. No entanto, um aumento da exposição em 100 vezes ao que foi registrado foi suficiente para

observação de efeitos subletais (100 ng s.a./abelha) conforme descrito em El Hassani *et al.* (2008) e alteração dos níveis de expressão gênica de genes relacionados com a capacidade de aprendizagem e memória (500 ng s.a./abelha) (SHI *et al.*, 2019).

A presença do acaricida coumafos nas colônias demonstrou ser residual. Esta molécula é comumente utilizada para o tratamento da varroose e que tem um elevado potencial de acumulação na cera (BAJUK *et al.*, 2017). Sendo assim, é provável que os valores detectados no néctar e no *bee bread* sejam devido à migração de coumafos da cera para estes recursos das colônias. De acordo com Kochansky, Wilzer e Feldlaufer (2001) é necessário a presença de pelo menos 1000 ppm (1000 mg/kg s.a.) de coumafos na cera para que essa migração aconteça.

As análises palinológicas evidenciaram que *Rubus sp.* (nome popular = silvas) é um gênero de grande importância apícola nas janelas do estudo. Assim sendo, uma vez que é utilizada para a produção de mel, ela será aproveitada como recurso chave durante o período de escassez no inverno. Caso o néctar coletado apresente resíduos de agrotóxicos, os efeitos podem não serem verificados a curto prazo, mas sim com uma elevada mortalidade no inverno. As *winter bees* podem viver durante seis meses ou mais, possuem uma taxa de senescência menor que as operárias de primavera/verão e são as que mais se alimentam de mel (RORTAIS *et al.*, 2005; MUNCH; KREIBICH; AMDAM, 2013) para aquecer a colônia. Neste estudo, as análises realizadas no néctar e mel quanto à presença de acetamiprida ou de outros compostos tóxicos para as abelhas, não detectaram quaisquer resíduos (acima do limite de detecção). Por isso, existe um risco muito baixo de ocorrer mortalidade de inverno derivada da acumulação de tóxicos no mel. Isso demonstra que as silvas não foram alvo de contaminação e é recomendado que em aplicações futuras se mantenha esse cuidado, até porque este gênero de plantas surge muitas vezes associado a pequenos cursos de água.

Ainda nesse sentido, com base nas análises palinológicas, é possível destacar que os *E. globulus* não apresentaram importância apícola como a vegetação arbustiva e subarbustiva, considerando que muitos são híbridos ou não atingem o período de floração

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo, por meio da abordagem multifatorial de avaliação da exposição, ressaltam que a aplicação pontual do inseticida não alterou o estado de saúde e desenvolvimento das colônias de *A. mellifera iberiensis*, a curto e longo prazo. Entretanto, as conclusões se aplicam as condições específicas do monitoramento em uma paisagem dominada por plantações de eucaliptos.

Neste estudo, concluímos que existem dois indicadores extremamente importantes e de simples implementação para uma melhor gestão das aplicações de agrotóxicos, como a utilização de balanças automáticas e as análises palinológicas. Os dados fornecidos automaticamente pelas balanças, permitem identificar as épocas de produção de mel e o período de maior coleta de recursos; os dados do pólen permitem identificar as espécies mais relevantes utilizadas pelas colônias na paisagem. No presente estudo, três espécies demonstraram grande relevância para as abelhas, sendo *Cistus ladanifer* (pólen), *Cytisus sp.* (pólen) e *Rubus sp.* (néctar). A floração destas espécies pode ser utilizada como bioindicador para reduzir ou evitar aplicações nesse período e conseqüentemente diminuir a exposição das colônias aos agrotóxicos. Estes achados demonstram a relevância dos estudos de monitoramento de colônias em campo e podem ajudar em futuros programas de avaliação de riscos para as abelhas em diferentes cenários agrícolas ou florestais.

## REFERÊNCIAS

- ABOU-SHAARA, H. F. The foraging behaviour of honey bees, *Apis mellifera*: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 59, n. 1, p. 1-10, 2014.
- AGUADO MARTIN, L. O.; CASTIEL, A. F.; SANDOVAL, E. V. **Guía de campo de los polinizadores de España**. 2. ed. Madrid: Mundi-Prensa, 2017. 364 p.
- AIZEN, M. A.; GARIBALDI, L. A.; CUNNINGHAM, S. A.; KLEIN, A. M. How much does agriculture depend on pollinators? Lessons from long-term trends in crop production. **Annals of Botany**, v. 103, n. 9, p. 1579-1588, 2009.
- ALBURAKI, M.; STECKEL, S. J.; WILLIAMS, M. T.; SKINNER, J. A.; TARPY, D. R.; MEIKLE, W. G.; ADAMCZYK, J.; STEWART, S. D. Agricultural landscape and pesticide effects on honey bee (Hymenoptera: Apidae) biological traits. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 3, p. 835-847, 2017.
- ALBURAKI, M.; CHEN, D.; SKINNER, J. A.; MEIKLE, W. G.; TARPY, D. R.; ADAMCZYK, J.; STEWART, S. D. Honey bee survival and pathogen prevalence: from the perspective of landscape and exposure to pesticides. **Insects**, v. 9, n. 2, p. 1-15, 2018.
- ALIOUANE, Y.; EL HASSANI, A. K.; GARY, V.; ARMENGAUD, C.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M. Subchronic exposure of honeybees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 113-122, 2009.
- ALVES, T. S.; PINTO, A.; VENTURA, P.; NEVES, C. J.; BIRON, D. G.; JUNIOR, A. C.; PAULA FILHO, P. L.; RODRIGUES, P. J. Automatic detection and classification of honey bee comb cells using deep learning. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 170, p. 1-14, 2020.
- BAJUK, B. P.; BABNIK, K.; SNOJ, T.; MILČINSKI, L.; OCEPEK, M. P.; ŠKOF, M.; JENČIČ, V.; FILAZI, A.; ŠTAJNBAHER, D.; KOBAL, S. Coumaphos residues in honey, bee brood, and beeswax after *Varroa* treatment. **Apidologie**, v. 48, n. 5, p. 588-598, 2017.
- BECHER, M. A.; GRIMM, V.; THORBEEK, P.; HORN, J.; KENNEDY, P. J.; OSBORNE, J. L. BEEHAVE: A systems model of honeybee colony dynamics and foraging to explore multifactorial causes of colony failure. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, n. 2, p. 470-482, 2014.
- BISHOP, G. H. Growth rates of honey bee larva. **Journal of Experimental Zoology**, v. 146, n. 1, p. 11-20, 1961.
- BOHME, F.; BISCHOFF, G.; ZEBITZ, C. P. W.; ROSENKRANZ, P.; WALLNER, K. Pesticide residue survey of pollen loads collected by honeybees (*Apis mellifera*) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. 1-21, 2018.
- BRANDT, A.; GORENFLO, A.; SIEDE, R.; MEIXNER, M.; BUCHLER, R. The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, v. 86, p. 40-47, 2016.

BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. **Pest Management Science**, v. 61, n. 8, p. 742-748, 2005.

CALDERONE, N. W. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 1-27, 2012.

CATRY, F. X.; MOREIRA, F.; DEUS, E.; SILVA, J. S.; ÁGUAS, A. Assessing the extent and the environmental drivers of *Eucalyptus globulus* wildling establishment in Portugal: results from a countrywide survey. **Biological Invasions**, v. 17, p. 3163-318, 2015.

CORDERO-RIVERA, A.; SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; ANDRES, J. A. Life cycle and biological control of the Eucalyptus snout beetle (Coleoptera, Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera, Mymaridae) in north-west Spain. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 1, n. 2, p. 103-109, 1999.

COSTANZA, R.; GROOT, R.; BRAAT, L.; KUBISZEWSKI, I.; FIORAMONTI, L.; SUTTON, P.; FARBER, S.; GRASSO, M. Twenty years of ecosystem services: How far have we come and how far do we still need to go? **Ecosystem Services**, v. 28, p. 1-16, 2017.

COUVILLON, M. J.; RIDDELL PEARCE, F. C.; HARRIS-JONES, E. L.; KUEPFER, A. M.; MACKENZIE-SMITH, S. J.; ROZARIO, L. A.; SCHURCH, R.; RATNIEKS, F. L. W. Intra-dance variation among waggle runs and the design of efficient protocols for honey bee dance decoding. **Biology Open**, v. 1, n. 5, p. 467-472, 2012.

CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e funções de sistemas**. São Paulo: UNESP, 2009. 416 p.

DAINAT, B.; vanENGELSDORP, D.; NEUMANN, P. Colony collapse disorder in Europe. **Environmental Microbiology Reports**, v. 4, n. 1, p. 123-125, 2012.

DELAPLANE, K. S.; van der STEEN, J.; GUZMAN-NOVOA, E. Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-12, 2013.

DOMINGUES, C. E. C.; ABDALLA, F. C.; BALSAMO, P. J.; PEREIRA, B. V. R.; HAUSEN, M. A.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotoxic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

ECHEVERRI-MOLINA, D.; SANTOLAMAZZA-CARBONE, S. Toxicity of synthetic and biological insecticides against adults of the Eucalyptus snout-beetle *Gonipterus scutellatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Pest Science**, v. 83, p. 297-305, 2010.

EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GARY, V.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 653-661, 2008.

European Food Safety Authority (EFSA). A mechanistic model to assess risks to honeybee colonies from exposure to pesticides under different scenarios of combined stressors and factors. **EFSA supporting publication**, v. 13, n. 7, p. 1-116, 2016a.

European Food Safety Authority (EFSA). Assessing the health status of managed honeybee colonies (HEALTHY-B): a toolbox to facilitate harmonised data collection. **EFSA Journal**, v. 588 14, n. 10, p. 1-241, 2016b.

European Food Safety Authority (EFSA). Panel on Plant Protection Products and their Residues. Statement on the suitability of the BEEHAVE model for its potential use in a regulatory context and for the risk assessment of multiple stressors in honeybees at the landscape level. **EFSA Journal**, v. 13, n. 6, p. 1-92, 2015.

European Food Safety Authority (EFSA). EFSA Guidance Document on the risk assessment of plant protection products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus spp.* and solitary bees). **EFSA Journal**, v. 11, n. 7, p. 268, 2013.

European Food Safety Authority (EFSA). Specifications for field data collection contributing to honey bee model corroboration and verification. **EFSA supporting publication**, v. 14, n. 5, p. 1-54, 2017.

FAIRBROTHER, A.; PURDY, J.; ANDERSON, T.; FELL, R. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 719-731, 2014.

FLORA-ON. **Flora de Portugal Interactiva**. Disponível em: <<https://flora-on.pt/>>. Acesso em: 11. Jan. 2020.

FLORES, J. M.; GIL, S.; PADILLA, F. Reliability of the main field diagnostic methods of *Varroa* in honey bee colonies. **Archivos de Zootecnia**, v. 64, n. 246, p. 161-166, 2015.

FRIOL, P. S.; CATAE, A. F.; TAVARES, D. A.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apiadae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56-66, 2017.

GARY, N. E.; LORENZEN, K. A method for collecting the honey-sac contents from honeybees. **Journal of Apicultural Research**, v. 15, n. 2, p. 73-79, 1976.

GIGAURI, M. **Effects of temporal and spatial variation of resources on the foraging patterns of honey bees in the agricultural landscape**. 2019. 57. f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2019.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1-16, 2015.

GUPTA, R. K. Taxonomy and distribution of different honeybee species. *In*: GUPTA, R. K.;

REYBROECK, W.; VEEN, J. W. (Eds.). **Beekeeping for Poverty Alleviation and Livelihood Security**. 1. ed. Netherlands: Springer, 2014, v. 1., p. 63-103.

HAN, W.; YANG, Y.; GAO, J.; ZHAO, D.; REN, C.; WANG, S.; ZHAO, S.; ZHONG, Y. Chronic toxicity and biochemical response of *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae) exposed to acetamiprid and propiconazole alone or combined. **Ecotoxicology**, v. 28, n. 4, p. 399-411, 2019.

HEIMBACH, F.; SCHMUCK, R.; GRUNEWALD, B.; CAMPBELL, P.; SAPPINGTON, K.; STEEGER, T.; DAVIES, L. P. The Challenge: Assessment of risks posed by systemic insecticides to hymenopteran pollinators: New perception when we move from laboratory via (semi-)field to landscape scale testing? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 17-24, 2017.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J. F.; AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 348-350, 2012a.

HENRY, M.; BÉGUIN, M.; REQUIER, F.; ROLLIN, O.; ODOUX, J.-F., AUPINEL, P.; APTEL, J.; TCHAMITCHIAN, S.; DECOURTYE, A. Response to comment on “A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees”. **Science**, v. 336, n. 348, p. 1453, 2012b.

HILÁRIO, S. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KLEINERT, A. M. P. Flight activity and colony strength in the stingless bee *Melipona bicolor bicolor* (Apidae, Meliponinae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 2, p. 299-306, 2000.

HUMAN, H.; BRODSCHNEIDER, R.; DIETEMANN, V.; DIVELY, G.; ELLIS, J. D.; FORSGREN, E.; FRIES, I.; HATJINA, F.; HU, F. L.; JAFFÉ, R.; JENSEN, A. B.; KOHLER, A.; MAGYAR, J. P.; OZKYRYM, A.; PIRK, C. W. W.; ROSE, R.; STRAUSS, U.; TANNER, G.; TARPY, D. R.; van der STEEN, J. J. M.; VAUDO, A.; VEJSNAES, F.; WILDE, J.; WILLIAMS, G. R.; ZHENG, H. Q. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 4, p. 1-53, 2013.

HUNG, K. J.; KINGSTON, J. M.; ALBRECHT, M.; HOLWAY, D. A.; KOHN, J. R. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1870, p. 1-8, 2018.

HURLEY, B. P.; GARNAS, J.; WINGFIELD, M. J.; BRANCO, M.; RICHARDSON, D. M.; SLIPPERS, B. Increasing numbers and intercontinental spread of invasive insects on eucalypts. **Biological Invasions**, v. 18, p. 921-933, 2016.

Instituto de Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF). **Manual de boas práticas: Gorgulho-do-eucalipto (*Gonipterus platensis*)**. Lisboa: Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas, 2015. 24 p.

JORDAN, G. J.; BORRALHO, N. M. G.; TILYARD, P.; POTTS, B. M. Identification of races in *Eucalyptus globulus ssp globulus* based on growth traits in Tasmania and geographic distribution. **Silvae Genetica**, v. 43, n. 5-6, p. 292-298, 1994.



KARABAGIAS, I. K.; MAIA, M.; KARABAGIAS, V. K.; GATZIAS, I.; BADEKA, A. V. Characterization of *Eucalyptus*, chestnut and heather honeys from Portugal using multi-parameter analysis and chemo-calculus. **Foods**, v. 7, n. 12, p. 1-25, 2018.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

KOCHANSKY, J.; WILZER, K.; FELDLAUFER, M. Comparison of the transfer of coumaphos from beeswax into syrup and honey. **Apidologie**, v. 32, n. 2, p. 119-125, 2001.

KOVÁCS-HOSTYÁNSZKI, A.; ESPÍNDOLA, A.; VANBERGEN, A. J.; SETTELE, J.; KREMEN, C.; DICKS, L. V. Ecological intensification to mitigate impacts of conventional intensive land use on pollinators and pollination. **Ecology Letters**, v. 20, n. 5, p. 673-689, 2017.

LEMANSKI, N. J.; BANSAL, S.; FEFFERMAN, N. H. The sensitivity of a honeybee colony to worker mortality depends on season and resource availability. **BMC Evolutionary Biology**, v. 20, n. 139, p. 1-9, 2020.

LI, J.; FENG, M.; BEGNA, D.; FANG, Y.; ZHENG, A. Proteome comparison of hypopharyngeal gland development between Italian and royal jelly producing worker honeybees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 12, p. 6578-6594, 2010.

LOCH, A. D. Mortality and recovery of eucalypt beetle pest and beneficial arthropod populations after commercial application of the insecticide alpha-cypermethrin. **Forest Ecology and Management**, v. 217, n. 2-3, p. 255-265, 2005.

LOCH, A. D.; MATSUKI, M. Effects of defoliation by Eucalyptus weevil, *Gonipterus scutellatus*, and chrysomelid beetles on growth of *Eucalyptus globulus* in southwestern Australia. **Forest Ecology and Management**, v. 260, n. 8, p. 1324-1332, 2010.

MANSILLA-VÁZQUEZ, J. P.; PÉREZ-OTERO, R. El defoliador del eucalipto *Gonipterus scutellatus*. **Phytoma España**, v. 81, n. 36-42, 1996.

MENEGUETTI, D. U. D. O. Biplantekalenderen 2013. **Tidsskrift For Biavl**, v. 8, n. 1, p. 55-56, 2013.

MICHENER, C. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. 953 p.

MORALES, M. M.; RAMOS, M. J. G.; VÁZQUEZ, P. P.; GALIANO, F. J. D.; VALVERDE, M. G.; LÓPEZ, V. G.; FLORES, J. M.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. **Science of The Total Environment**, v. 710, p. 1-10, 2020.

MORSE, R. A.; CALDERONE, N. W. The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. **Bee Cult**, v. 128, p. 1-15, 2000.

MULLIN, C. A.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J. L.; ASHCRAFT, S.; SIMONDS, R.; PETTIS, J. S. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. **PLoS One**, v. 5, n. 3, 1-22, 2010.

MUNCH, D.; KREIBICH, C. D.; AMDAM, G. V. Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 1638-1649, 2013.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee colony losses. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2010.

NIELL, S.; JESÚS, F.; DÍAZ, R.; MENDOZA, Y.; NOTTE, G.; SANTOS, E.; GÉREZ, N.; CANCELA, H.; HEINZEN, H. Beehives biomonitor pesticides in agroecosystems: Simple chemical and biological indicators evaluation using Support Vector Machines (SVM). **Ecological Indicators**, v. 91, p. 149-154, 2018.

ODOUX, J. F.; AUPINEL, P.; GATEFF, S.; REQUIER, F.; HENRY, M.; BRETAGNOLLE, V. ECOBEE: a tool for long-term honey bee colony monitoring at the landscape scale in West European intensive agroecosystems. **Journal of Apicultural Research**, v. 53, n. 1, p. 57-66, 2014.

OLLERTON, J. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 48, p. 353-376, 2017.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, n. 3, p. 321-326, 2011.

PÉREZ-OTERO, R.; MANSILLA-VÁZQUES, P.; RODRÍGUEZ IGLESIAS, J. Eficacia y efectos en laboratorio de diferentes insecticidas en el control del defoliador del eucalipto *Gonipterus scutellatus* y de su parasitoide *Anaphes nitens*. **Boletín de Sanidad Vegetal Plagas**, v. 29, n. 4, p. 649-658, 2003.

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, p. 1-9, 2013.

REIS, A. R.; FERREIRA, L.; TOMÉ, M.; ARAUJO, C.; BRANCO, M. Efficiency of biological control of *Gonipterus platensis* (Coleoptera: Curculionidae) by *Anaphes nitens* (Hymenoptera: Mymaridae) in cold areas of the Iberian Peninsula: Implications for defoliation and wood production in *Eucalyptus globulus*. **Forest Ecology and Management**, v. 270, p. 216-222, 2012.

REQUIER, F. Bee colony health indicators: synthesis and future directions. **CAB Reviews**, v. 14, n. 56, p. 1-12, 2019.

ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.;

PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Effects of sublethal dose of fipronil on neuron metabolic activity of Africanized honeybees. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 456-466, 2013.

RORTAIS, A.; ARNOLD, G.; HALM, M. P.; TOUFFET-BRIENS, F. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. **Apidologie**, v. 36, n. 1, p. 71-83, 2005.

RORTAIS, A.; STOUT, J.; DORNE, J.; HARDY, T. Editorial: EFSA calls for integrated and coordinated actions at EU and international levels to address global declines of pollinators. **EFSA Journal**, v. 11, n. 7, p. 10-12, 2013.

ROSZKO, M. Ł.; KAMIŃSKA, M.; SZYMCZYK, K.; JEŃDRZEJCZAK, R. Levels of selected persistent organic pollutants (PCB, PBDE) and pesticides in honey bee pollen sampled in Poland. **PLoS One**, v. 11, n. 12, 2016.

SÁENZ LAÍN, C.; FERRERAS, C. G. **Mieles españolas: características e identificación mediante el análisis del polen**. Madrid: Mundi-Prensa, 2000. 163 p.

SAMARGHANDI, M. R.; MOHAMMADI, M.; KARAMI, A.; TABANDEH, L.; DARGAHI, A.; AMIRIAN, F. Residue analysis of pesticides, herbicides, and fungicides in various water sources using gas chromatography-mass detection. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 5, p. 2189-2195, 2017.

SANTOLAMAZZA-CARBONE, S.; ANA-MAGÁN, F. J. F. Testing of selected insecticides to assess the viability of the integrated pest management of the Eucalyptus snout-beetle *Gonipterus scutellatus* in north-west Spain. **Journal of Applied Entomology**, v. 128, n. 9-10, p. 620-627, 2004.

SCHÜRCH, R.; COUVILLON, M. J.; BURNS, D. D. R.; TASMAN, K.; WAXMAN, D.; RATNIEKS, F. L. W. Incorporating variability in honey bee waggle dance decoding improves the mapping of communicated resource locations. **Journal of Comparative Physiology**, v. 199, n. 12, p. 1143-1152, 2013.

SEELEY, T. D.; VISSCHER, P. K. Survival of honeybees in cold climates: the critical timing of colony growth and reproduction. **Ecological Entomology**, v. 10, n. 1, p. 81-88, 1985.

SHI, J.; YANG, H.; YU, L.; LIAO, C.; LIU, Y.; JIN, M.; YAN, W.; WU, X. B. Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. **Science of The Total Environment**, v. 738, p. 1-7, 2020a.

SHI, J.; ZHANG, R.; PEI, Y.; LIAO, C.; WU, X. Exposure to acetamiprid influences the development and survival ability of worker bees (*Apis mellifera* L.) from larvae to adults. **Environmental Pollution**, v. 266, n. 2, p. 1-9, 2020b.

SHI, J.; LIAO, C.; WANG, Z.; ZENG, Z.; WU, X. Effects of sublethal acetamiprid doses on the lifespan and memory-related characteristics of honey bee (*Apis mellifera*) workers. **Apidologie**, v. 50, n. 4, p. 553-563, 2019.

SILVA, C. A. S.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; DOMINGUES, C. E. C.; ABDALLA, F.

C.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Fipronil effect on the frequency of anomalous brood in honeybee reared in vitro. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 450, p. 140, 2015.

SOUSA, E. M. R.; FERREIRA, L. J. C. *Gonipterus scutellatus* Gyll., uma nova praga do eucalipto em Portugal. **Revista Florestal**, v. 9, p. 4-7, 1996.

SPONSLER, D. B.; JOHNSON, R. M. Mechanistic modeling of pesticide exposure: the missing keystone of honey bee toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 4, p. 871-881, 2017.

SWITANEK, M.; CRAILSHEIM, K.; TRUHETZ, H.; BRODSCHNEIDER, R. Modelling seasonal effects of temperature and precipitation on honey bee winter mortality in a temperate climate. **Science of The Total Environment**, v. 579, p. 1581-1587, 2017.

TADEI, R.; DOMINGUES, C. E. C.; MALAQUIAS, J. B.; CAMILO, E. V.; MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 673, p. 1-11, 2019.

TALAVERA, S.; HERRERA, J.; ARROYO, J.; ORTIZ, P. L.; DEVESA, J. A. Estudio de la flora apícola de andalucía occidental. **Lagascalía**, v. 15 (extra), p. 567-591, 1988.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370-378, 2015.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Exposure to thiamethoxam during the larval phase affects synapsin levels in the brain of the honey bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 523-528, 2019.

TISON, L.; HOLTZ, S.; ADEOYE, A.; KALKAN, O.; IRMISCH, N. S.; LEHMANN, N.; MENZEL, R. Effects of sublethal doses of thiacloprid and its formulation Calypso® on the learning and memory performance of honey bees. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, p. 3695-3705, 2017.

TISON, L.; RÖBNER, A.; GERSCHEWSKI, S.; MENZEL, R. The neonicotinoid clothianidin impairs memory processing in honey bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 139-145, 2019.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 339-364, 2003.

TSCHARNTKE, T.; KLEIN, A. M.; KRUESS, A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; THIES, C. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity - ecosystem service management. **Ecology Letters**, v. 8, n. 8, p. 857-874, 2005.

URBANOWICZ, C.; BAERT, N.; BLUHER, S. E.; BÖRÖCZKY, K.; RAMOS, M.; McART,

S. H. Low maize pollen collection and low pesticide risk to honey bees in heterogeneous agricultural landscapes. **Apidologie**, v. 50, p. 379-390, 2019.

UNDERWOOD, R.; vanENGELSDORP, D. Colony Collapse Disorder: have we seen this before? **Bee Culture**, v. 35, p. 13-18, 2007.

VALENTE, C.; MACHADO, H.; SILVA, M. Pragas e doenças do eucalipto. *In*: VALENTE, C.; PAIVA, M. R. (Eds.). **Pragas e doenças em pinhal e eucaliptal - desafios para a sua gestão integrada**. Lisboa: ISA Press, 2008. p. 37-51.

vanENGELSDORP, D.; EVANS, J. D.; SAEGERMAN, C.; MULLIN, C.; HAUBRUGE, E.; NGUYEN, B. K.; FRAZIER, M.; FRAZIER, J.; COX-FOSTER, D.; CHEN, Y.; UNDERWOOD, R.; TARPY, D. R.; PETTIS, J. S. Colony Collapse Disorder: a descriptive study. **PLoS One**, v. 4, n. 8, p. 1-17, 2009.

vanENGELSDORP, D.; HAYES, J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. S. A survey of honey bee colony losses in the United States, fall 2008 to spring 2009. **Journal of Agricultural Research**, v. 49, p. 7-14, 2010.

vanENGELSDORP, D.; MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 580-595, 2010.

VANNETTE, R. L.; MOHAMED, A.; JOHNSON, B. R. Forager bees (*Apis mellifera*) highly express immune and detoxification genes in tissues associated with nectar processing. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-9, 2015.

VIANA, B. F.; BOSCOLO, D.; MARIANO NETO, E.; LOPES, L. E.; LOPES, A. V.; FERREIRA, P. A.; PIGOZZO, C. M.; PRIMO, L. M. How well do we understand landscape effects on pollinators and pollination services? **Journal of Pollination Ecology**, v. 7, n. 5, p. 31-41, 2012.

VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUÈS, B.; BRUNET, J.-L.; TEXIER, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; EL ALAOU, H.; BELZUNCES, L. P.; DELBAC, F. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2011.

WANG, Y.; ZHU, Y. C.; LI, W. Interaction patterns and combined toxic effects of acetamiprid in combination with seven pesticides on honey bee (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, n. 1, p. 1-10, 2020.

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

WILLIAMSON, S. M.; WRIGHT, G. A. Exposure to multiple cholinergic pesticides impairs olfactory learning and memory in honeybees. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 10, p. 1799-1807, 2013.

WOOD, T. J.; GOULSON, D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17285-17325, 2017.

WU, Y. Y.; LUO, Q. H.; HOU, C. S.; WANG, Q.; DAI, P. L.; GAO, J.; LIU, Y. J.; DIAO, Q. Y. Sublethal effects of imidacloprid on targeting muscle and ribosomal protein related genes in the honey bee *Apis mellifera* L. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-8, 2017.

YANG, Y.; MA, S.; LIU, F.; WANG, Q.; WANG, X.; HOU, C.; WU, Y.; GAO, J.; ZHANG, L.; LIU, Y.; DIAO, Q.; DAI, P. Acute and chronic toxicity of acetamiprid, carbaryl, cypermethrin and deltamethrin to *Apis mellifera* larvae reared in vitro. **Pest Management Science**, v. 76, n. 3, p. 978-985, 2019.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1

**TABELA 3** - Parâmetros climáticos externos do apiário controle durante o período do estudo.

<b>Apiário controle</b>					
<b>Meses</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Umidade relativa (%)</b>	<b>Pluviosidade (mm)</b>	<b>Radiação solar (wat/m2)</b>	<b>Velocidade do vento (Km/h)</b>
Março	14,55 (±4,56)	53,91 (±15,92)	0	108,54	0,02
Abril	12,68 (±5,76)	72,10 (±21,09)	0,02	136,45	0,35
Maiο	19,92 (±6,75)	48,17 (±22,90)	0	205,12	0,31
Junho	20,22 (±6,95)	52,21 (±22,47)	0	198,38	0,43
Julho	24,78 (±7,14)	49,49 (±22,76)	0	212,18	0,45
Agosto	25,05 (±6,59)	47,73 (±22,17)	0	185,70	0,32

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**TABELA 4** - Parâmetros climáticos externos do apiário com aplicação do inseticida acetamiprida (EPIK SG<sup>®</sup>) durante o período do estudo.

<b>Apiário com aplicação pontual de acetamiprida</b>					
<b>Meses</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Umidade relativa (%)</b>	<b>Pluviosidade (mm)</b>	<b>Radiação solar (wat/m2)</b>	<b>Velocidade do vento (km/h)</b>
Março	13,94 (±4,62)	52,58 (±12,51)	0,02	108,61	0
Abril	12,34 (±5,63)	73,74 (±20,46)	0,02	86,26	0,20
Maiο	19,21 (±6,72)	50,25 (±21,49)	0	110,81	0,10
Junho	20,00 (±6,80)	53,50 (±21,90)	0	115,35	0,11
Julho	24,93 (±6,80)	48,53 (±20,56)	0	120,37	0,08
Agosto	24,82 (±6,40)	48,18 (±20,89)	0	106,30	0,06

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos por meio do presente estudo, pode-se concluir que:

- As concentrações residuais do fungicida piraclostrobina demonstraram toxicidade para a espécie exótica *A. mellifera* Africanizada e para a espécie brasileira nativa *M. scutellaris*.

- O piraclostrobina pode induzir respostas tardias em abelhas recém-emergidas de *A. mellifera* Africanizada, mesmo após exposição durante a fase larval, comprovadas por meio das análises de morte celular no intestino e pela quantificação de quitina da matriz peritrófica.

- As análises de sobrevivência, histológicas e histoquímicas (intestino médio), comprovaram que as forrageiras de *A. mellifera* Africanizada são mais sensíveis as concentrações residuais do piraclostrobina que as operárias recém-emergidas. Contudo, ficou elucidado que ambas as idades apresentaram respostas frente a exposição ao piraclostrobina, sendo que a saúde da colônia pode ser comprometida.

- As forrageiras de *M. scutellaris* evidenciaram que são muito sensíveis as concentrações residuais do piraclostrobina e, em virtude das características da colônia dessa espécie, os efeitos adversos provavelmente são mais difíceis de recuperar que nas abelhas melíferas.

- A aplicação pontual do inseticida acetamiprida, em uma paisagem dominada por eucaliptos, não alterou o desenvolvimento das colônias de *A. mellifera iberiensis*. Entretanto, resíduos de acetamiprida foram detectados nos recursos coletados pelas abelhas.

- As análises palinológicas identificaram que espécies arbustivas e subarbustivas, *Cistus ladanifer*, *Cytisus sp.* e *Rubus sp.* são as mais utilizadas como recursos, pólen e néctar, pelas colônias nas paisagens dominadas por eucaliptos.

- A implementação de balanças automáticas nas colônias e as análises palinológicas das espécies botânicas, podem subsidiar programas de monitoramento de abelhas em paisagens com aplicações de agrotóxicos.

- Diante dos fatos apresentados, esta pesquisa contribuiu fortemente para estreitar as lacunas de conhecimento em relação os efeitos dos fungicidas em abelhas, com base nos resultados obtidos dos múltiplos parâmetros analisados. Nessa perspectiva, os dados gerados apontam os riscos associados dos fungicidas em organismos não-alvo e enfatizam a importância dos biomarcadores utilizados nos estudos ecotoxicológicos com abelhas. Indo ao encontro, foi possível destacar a relevância do gerenciamento das colônias nas paisagens de



eucaliptos onde os agrotóxicos, como o acetamiprida, são aplicados e a influência do manejo adequado nestas áreas, contribuindo para um melhor monitoramento de avaliação de risco para as abelhas. A pesquisa ainda pode se subdividir para diferentes áreas, como forma de expandir e agregar ainda mais conhecimento a respeito do tema aqui abordado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASCO. **Dossiê Abrasco**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Disponível em: < <https://abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/>>. Acesso em: 17 Ago. 2020.
- BALLIVIAN, J. M. P. **Abelhas nativas sem ferrão**. 1. ed. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128 p.
- BALSAMO, P. J.; DOMINGUES, C. E. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; GREGORC, A.; IRAZUSTA, S. P.; SALLA, R. F.; COSTA, M. J.; ABDALLA, F. C. Impact of sublethal doses of thiamethoxam and *Nosema ceranae* inoculation on the hepato-nephrotoxic system in young Africanized *Apis mellifera*. **Journal of Apicultural Research**, v. 1, p. 1-12, 2019.
- BARTLETT, D. W.; CLOUGH, J. M.; GODWIN, J. R.; HALL, A. A.; HAMER, M. PARR-DOBZANSKI, B. The strobilurin fungicides. **Pest Management Science**, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002.
- BASS, C.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R. The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 78-87, 2015.
- BATTAGLIN, W. A.; SANDSTROM, M. W.; KUIVILA, K. M.; KOLPIN, D. W.; MEYER, M. T. Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other Fungicides in US streams, 2005-2006. **Water Air & Soil Pollution**, v. 218, p. 307-322, 2011.
- BOYD, J.; BANZHAF, S. What are ecosystem services? The need for standardized environmental accounting units. **Ecological Economics**, v. 63, n. 2-3, p. 616-626, 2007.
- BRODSCHNEIDER, R.; GRAY, A.; ADJLANE, N.; BALLIS, A.; BRUSBARDIS, V.; CHARRIÈRE, J.-D.; CHLEBO, R.; COFFEY, M. F.; DAHLE, B.; GRAAF, D. C.; DRAZIC, M. M.; EVANS, G. *et al.* Multi-country loss rates of honey bee colonies during winter 2016/2017 from the COLOSS survey. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, p. 452-457, 2018.
- BUCHMANN, S. L.; HURLEY, J. P. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 72, p. 639-657, 1978.
- CARTHEW, S. M.; GOLDINGAY, R. L. Non-flying mammals as pollinators. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 3, p. 104-108, 1997.
- CARVALHO, S. M.; ROAT, T.; PEREIRA, A. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; NOCELLI, R. C. F.; CARVALHO, C.; MALASPINA, O. Losses of Brazilian bees: an overview of factors that may affect these pollinators. **Julius-Kühn Archives**, v. 437, p. 159-166, 2012.
- CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. A. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; OLIVEIRA, A. J. B.; SAKAGUTI, E. S.; ATTENCIA, V. M.; COSTA, F. M.; MITSUI, M. H. Pollination of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) by Honeybees (*Apis mellifera* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 1, p. 31-36, 2005.

CHIARI, W. C.; TOLEDO, V. A. A.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C.; TOLEDO, T. C. S. O. A.; LOPES, T. S. Polinização por *Apis mellifera* em soja transgênica (*Glycine max* L. Merrill) Rondoup Ready™ cv. BRS 245 RR e convencional cv. BRS 133. **Acta Scientiarum Agronomy (Online)**, v. 30, n. 2, p. 267-271, 2008.

COSTA, M. S.; SILVA, R. J.; PAULINO-NETO, H. F.; PEREIRA, M. J. B. Beetle pollination and flowering rhythm of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) in Brazilian cerrado: Behavioral features of its principal pollinators. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. 1-14, 2017.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R. V.; PARUELO, J.; RASKIN, R. G.; SUTTON, P.; van den BELT, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, p. 253-260, 1997.

COSTANZA, R.; GROOT, R.; BRAAT, L.; KUBISZEWSKI, I.; FIORAMONTI, L.; SUTTON, P.; FARBER, S.; GRASSO, M. Twenty years of ecosystem services: How far have we come and how far do we still need to go? **Ecosystem Services**, v. 28, p. 1-16, 2017.

COX-FOSTER, D. L.; CONLAN, S.; HOLMES, E. C.; PALACIOS, G.; EVANS, J. D.; MORAN, N. A.; QUAN, P.-L.; BRIESE, T.; HORNIG, M.; GEISER, D. M.; MARTINSON, V.; vanENDELSDORP, D. *et al.* A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 283-287, 2007.

CRUZ-LANDIM, C.; RODRIGUES, L. Comparative anatomy and histology of the alimentary canal of adult Apinae. **Journal of Apicultural Research**, v. 6, n. 1, p. 17-28, 1967.

CULLEN, M. G.; THOMPSON, L. J.; CAROLAN, J. C.; STOUT, J. C.; STANLEY, D. A. Fungicides, herbicides and bees: a systematic review of existing research and methods. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. 1-17, 2019.

DAILY, G. C. **Nature's services: societal dependence on natural ecosystems**. 1. ed. Washington: Island Press, 1997. 392 p.

DAVID, A.; BOTÍAS, C.; ABDUL-SADA, A.; NICHOLLS, E.; ROTHERAY, E. L.; HILL, E. M.; GOULSON, D. Widespread contamination of wildflower and bee-collected pollen with complex mixtures of neonicotinoids and fungicides commonly applied to crops. **Environment International**, v. 88, p. 169-178, 2016.

DE JONG, D. Africanized honey bees in Brazil, forty years of adaptation and success. **Bee World**, v. 77, n. 2, p. 67-70, 1996.

DEGRANDI-HOFFMAN, G.; CHEN, Y.; DEJONG, E. W.; CHAMBERS, M. L.; HIDALGO, G. Effects of oral exposure to fungicides on honey bee nutrition and virus levels. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 6, p. 2518-2528, 2015.

DELLINGER, A. S.; PENNEYS, D. S.; STAEDLER, Y. M.; FRAGNER, L.; WECKWERTH, W.; SCHONENBERGER, J. A specialized bird pollination system with a

bellows mechanism for pollen transfer and staminal food body rewards. **Current Biology**, v. 24, p. 1615-1619, 2014.

DOMINGUES, C. E. C.; ABDALLA, F. C.; BALSAMO, P. J.; PEREIRA, B. V. R.; HAUSEN, M. A.; COSTA, M. J.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Thiamethoxam and picoxystrobin reduce the survival and overload the hepato-nephrotic system of the Africanized honeybee. **Chemosphere**, v. 186, p. 994-1005, 2017.

DORIGO, A. S.; ROSA-FONTANA, A.; SOARES-LIMA, H. M.; TEIXEIRA, J. S. G.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. In vitro larval rearing protocol for the stingless bee species *Melipona scutellaris* for toxicological studies. **PLoS One**, v. 14, p. 1-17, 2019.

EL HASSANI, A. K.; DACHER, M.; GARY, V.; LAMBIN, M.; GAUTHIER, M.; ARMENGAUD, C. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 653-661, 2008.

ELLIS, J.; EVANS, J. D.; PETTIS, J. Colony losses, managed colony population decline, and Colony Collapse Disorder in the United States. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 134-136, 2010.

FERREIRA, J.; PARDINI, R.; METZGER, J. P.; FONSECA, C. R.; POMPEU, P. S.; SPAROVEK, G.; LOUZADA, J. Towards environmentally sustainable agriculture in Brazil, challenges and opportunities for applied ecological research. **Journal of Applied Ecology**, v. 49, p. 535-541, 2012.

FRIOL, P. S.; CATAE, A. F.; TAVARES, D. A.; MALASPINA, O.; ROAT, T. C. Can the exposure of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) larvae to a field concentration of thiamethoxam affect newly emerged bees? **Chemosphere**, v. 185, p. 56-66, 2017.

GALLAI, N.; SALLES, J.-M.; SETTELE, J.; VAISSIÈRE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.

GARY, N.; DALY, H. V.; LOCKE, S.; RACE, M. The africanized honey bee: ahead of schedule. **California Agriculture**, v. 39, n. 11-12, p. 4-7, 1985.

GIANNINI, T. C.; BOFF, S.; CORDEIRO, G. D.; CARTOLANO JR, E. A.; VEIGA, A. K.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M. Crop pollinators in Brazil: a review of reported interactions. **Apidologie**, v. 46, p. 209-223, 2015b.

GIANNINI, T. C.; CORDEIRO, G. D.; FREITAS, B. M.; SARAIVA, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 849-857, 2015a.

GOULSON, D.; NICHOLLS, E.; BOTÍAS, C.; ROTHERAY, E. L. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1-16, 2015.

GYORI, J.; FARKAS, A.; STOLYAR, O.; SZEKACS, A.; MORTL, M.; VEHVSZKY, A.

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

HAHN, M.; BRUHL, C. A. The secret pollinators: an overview of moth pollination with a focus on Europe and North America. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 10, p. 21-28, 2016.

HAN, W.; TIAN, Y.; SHEN, X. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. **Chemosphere**, v. 192, p. 59-65, 2018.

HANLEY, N.; BREEZE, T. D.; ELLIS, C.; GOULSON, D. Measuring the economic value of pollination services: Principles, evidence and knowledge gaps. **Ecosystem Services**, v. 14, p. 124-132, 2015.

HEIMBACH, F.; SCHMUCK, R.; GRUNEWALD, B.; CAMPBELL, P.; SAPPINGTON, K.; STEEGER, T.; DAVIES, L. P. The Challenge: Assessment of risks posed by systemic insecticides to hymenopteran pollinators: New perception when we move from laboratory via (semi-)field to landscape scale testing? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 17-24, 2017.

HEIN, L. The economic value of the pollination service, a review across scales. **The Open Ecology Journal**, v. 2, p. 74-82, 2009.

HUNG, J.-L. J.; KINGSTON, J. M.; ALBRECHT, M.; HOLWAY, D. A.; KOHN, J. R. The worldwide importance of honey bees as pollinators in natural habitats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1870, p. 1-8, 2018.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NUNES-SILVA, P. As abelhas, os serviços ecossistêmicos e o Código Florestal Brasileiro. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 4, p. 59-62, 2010.

IPBES. The assessment report of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services on pollinators, pollination and food production. In: POTTS, S. G.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; NGO, H. T. (Eds). **Secretariat of the Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services**, Bonn: IPBES, 2016. 552 p.

JACOB, C. R. O.; SOARES, H. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Pest Management Science**, v. 71, p. 114-122, 2015.

KERR, W. E. The history of the introduction of African bees to Brazil. **South African Bee Journal**, v. 39, n. 2, p. 3-5, 1967.

KLATT, B. K., HOLZSCHUH, A.; WESTPHAL, C.; CLOUGH, Y.; SMIT, I.; PAWELZIK, E.; TSCHARNTKE, T. Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 281, p. 1-8, 2014.

KLEIN, A. M.; VAISSIÈRE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1608, p. 303-313, 2007.

LOURENÇO, C. T.; CARVALHO, S. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Oral toxicity of fipronil insecticide against the stingless bee *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 921-924, 2012.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 16 Ago. 2020.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/ap\\_ing\\_ativo\\_detalhe\\_cons?p\\_id\\_ingrediente\\_ativo=4](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_ing_ativo_detalhe_cons?p_id_ingrediente_ativo=4)>. Acesso em: 03 Fev. 2021.

MARIANO, L. C.; GRELLA, T. C.; BARBOSA, R. A.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 62, p. 578-582, 2016.

MICHENER, C. **The Bees of the World**. 2. ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2007. 953 p.

MORTON, V.; STAUB, T. A short history of fungicides. **The American Phytopathological Society net Feature**, 2008.

Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Fungicides.aspx>>. Acesso em: 10 Ago. 2020.

NEUMANN, P.; CARRECK, N. L. Honey bee Colony Losses. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, n. 1, p. 1-6, 2010.

NIELL, S.; JESÚS, F.; PÉREZ, N.; PÉREZ, C.; PAREJA, L.; ABBATE, S.; CARRASCO-LETELIER, L.; DÍAZ, S.; MENDOZA, Y.; CESIO, V.; HEINZEN, H. Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor. **Science of The Total Environment**, v. 581-582, p. 25-31, 2017.

NUNES-SILVA, P.; HRNCIR, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 140-151, 2010.

OBUTE, G. C. Pollination: A threatened vital biodiversity service to humans and the environment. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 2, n. 1. p. 1-13, 2010.

OLLERTON, J.; WINFREE, R.; TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321-326, 2011.

PARK, M. G.; BLITZER, E. J.; GIBBS, J.; LOSEY, J. E.; DANFORTH, B. N. Negative effects of pesticides on wild bee communities can be buffered by landscape context. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1809, p. 1-9, 2015.

PARREIRA, D. F.; NEVES, W. S.; ZAMBOLIN, L. Resistência de fungos a fungicidas inibidores de quinona. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 3, n. 2, p. 24-34, 2009.

PATON, A. J.; BRUMMITT, N.; GOVAERTS, R.; HARMAN, K.; HINCHCLIFFE, S.; ALLKIN, B.; LUGHADHA E. N. Towards target 1 of the global strategy for plant conservation: a working list of all known plant species-progress and prospects. **Taxon**, v. 57, n. 2, p. 602-611, 2008.

PEDRO, S. R. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014.

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, p. 1-9, 2013.

PIRES, C. S. S.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O.; PETTIS, J. S.; TEIXEIRA, E. W. Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 422-442, 2016.

POTTS, S. G.; ROBERTS, S.; DEAN, R.; MARRIS, G.; BROWN, M.; JONES, R.; NEUMANN, P.; SETTELE, J. Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. **Journal of Apicultural Research**, v. 49, p. 15-22, 2010.

REDDI, C. S.; BAI, G. M. Butterflies and pollination biology. **Proceedings: Animal Sciences**, v. 93, n. 4, p. 391-396, 1984.

ROAT, T. C.; SANTOS-PINTO, J. R. A.; SANTOS, L. D.; SANTOS, K. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Modification of the brain proteome of Africanized honeybees (*Apis mellifera*) exposed to a sub-lethal doses of the insecticide fipronil. **Ecotoxicology**, v. 23, p. 1659-1670, 2014.

ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Biochemical response of the Africanized honeybee exposed to fipronil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 6, p. 1652-1660, 2017.

SAZIMA, M.; BUZATO, S.; SAZIMA, I. Bat-pollinated flower assemblages and bat visitors at two Atlantic forest sites in Brazil. **Annals of Botany**, v. 83, p. 705-712, 1999.

SCHMIDT, J. O. Bee Products. In: MIZRAHI, A.; LENSKY, Y. (Eds.). **Bee Products**. Boston: Springer, 1997, p. 15-26.

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). **Cytobios**, v. 88, n. 354, p. 161-171, 1996.

SHI, J.; YANG, H.; YU, L.; LIAO, C.; LIU, Y.; JIN, M.; YAN, W.; WU, X. B. Sublethal acetamiprid doses negatively affect the lifespans and foraging behaviors of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers. **Science of The Total Environment**, v. 738, p. 1-7, 2020.

SILVA, W. P.; 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, C. I.; PACHECO FILHO, A. J. S.; FREITAS, B. M. Polinizadores manejados no Brasil e sua disponibilidade para a agricultura. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (Org.). **Agricultura e Polinizadores**. 1. ed. São Paulo: A.B.E.L.H.A, 2015, v. 1, p. 19-31.

SOARES, H. M.; JACOB, C. R. O.; CARVALHO, S. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 94, p. 675-680, 2015.

SSYMANK, A.; KEARNS, C. A.; PAPE, T.; THOMPSON, F. C. Pollinating Flies (Diptera): A major contribution to plant diversity and agricultural production. **Biodiversity**, v. 9, n. 1-2, p. 86-89, 2008.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; CARVALHO, S. M.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; MALASPINA, O. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 135, p. 370-378, 2015.

TAVARES, D. A.; ROAT, T. C.; SILVA-ZACARIN, E. C. M.; NOCELLI, R. C. F.; MALASPINA, O. Exposure to thiamethoxam during the larval phase affects synapsin levels in the brain of the honey bee. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 523-528, 2019.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 339-364, 2003.

van der VALK; KOOMEN, I.; NOCELLI, R. C. F.; RIBEIRO, M. F.; FREITAS, B. M.; CARVALHO, S.; KASINA, J. M.; MARTINS, D.; MUTISO, G.; ODHIAMBO, C.; KINUTHIA, W.; GIKUNGU, M. *et al.* Aspects determining the risk of pesticides to wild bees: risk profiles for focal crops on three continents. **Julius-Kühn-Archiv**, v. 437, p. 142-158, 2012.

vanENGELSDORP, D.; HAYES, J.; UNDERWOOD, R. M.; PETTIS, J. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. **PLoS One**, v. 3, n. 12, p. 1-6, 2008.

vanENGELSDORP, D.; HAYES, J. JR.; UNDERWOOD, R. M.; CARON, D.; PETTIS, J. A survey of managed honey bee colony losses in the USA, fall 2009 to winter 2010. **Journal of Apicultural Research**, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2011.

WANG, Y.; ZHU, Y. C.; LI, W. Interaction patterns and combined toxic effects of acetamiprid in combination with seven pesticides on honey bee (*Apis mellifera* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 190, n. 1, p. 1-10, 2020.

WOOD, T. J.; GOULSON, D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17285-17325, 2017.



## ANEXOS

### ANEXO 1

#### ***Protocolo Hematoxilina e Eosina (HE)***

A técnica de HE permite a diferenciação de estruturas celulares ácidas e básicas. A hematoxilina é um corante básico que tem afinidade por substâncias ácidas ( $\text{pH} < 7,0$ ), como o núcleo e o retículo endoplasmático rugoso (estruturas basófilas). A eosina é um corante ácido que tem afinidade por substâncias básicas ( $\text{pH} > 7,0$ ), como o citoplasma (estruturas acidófilas). A metodologia da técnica seguiu os procedimentos abaixo:

- Filtrar os corantes antes de sua utilização
- Hidratar as lâminas por 10 minutos em água destilada
- Hematoxilina de Harris por 10 minutos
- Deixar reagindo em água corrente por 5 minutos
- Lavar em água destilada
- Eosina aquosa (0,5%) por 5 minutos
- Lavar em água corrente
- Secar em temperatura ambiente e montar com meio de montagem (*Dibutylphthalate Polystyrene Xylene - Mounting Medium*) (*DPX - Mounting Medium*).

## ANEXO 2

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

A técnica histoquímica utilizando o PAS tem como princípio identificar glicogênio e glicoconjugados neutros (carboidratos, glicoproteínas, polissacarídeos neutros e ácidos) nas estruturas celulares, que são evidenciados com coloração magenta. A metodologia da técnica seguiu os procedimentos abaixo:

- Hidratar as lâminas por 10 minutos em água destilada
- Ácido periódico 0,4% por 10 minutos
- Lavar em água destilada
- Reativo de *Schiff* por 1 hora no escuro
- Lavar em água sulforosa, 3 banhos de 1 minuto
- Lavar em água corrente 10 a 30 minutos
- Secar em temperatura ambiente e montar com meio de montagem (*DPX - Mounting Medium*).

### ANEXO 3

#### *Protocolo Azul de Bromofenol*

A técnica histoquímica utilizando o azul de bromofenol tem como princípio identificar proteínas totais, que são evidenciadas com coloração azul. A metodologia da técnica seguiu os procedimentos abaixo:

- Hidratar as lâminas por 10 minutos em água destilada
- Azul de bromofenol por 1 hora no escuro
- Lavar em ácido acético 0,5% por 1 a 5 minutos
- Lavar em água corrente por 5 a 10 minutos
- Secar em temperatura ambiente e montar com meio de montagem (*DPX - Mounting Medium*).