
ECOLOGIA

CATARINA RIBEIRO CUNHA

Efeito de concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, isolados e combinados, na morfologia celular intestinal da abelha *Apis Mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)

CATARINA RIBEIRO CUNHA

Efeito de concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, isolados e combinados, na morfologia celular intestinal da abelha *Apis Mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Ecóloga

Orientador: Daiana Antonia Tavares

Coorientador: Tatiane Caroline Grella

Supervisor: Osmar Malaspina

Rio Claro - SP
2022

C972e Cunha, Catarina Ribeiro
Efeito de concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, isolados e combinados, na morfologia celular intestinal da abelha *Apis Mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) / Catarina Ribeiro Cunha. - Rio Claro, 2022
27 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado – Ecologia) –
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências,
Rio Claro

Orientadora: Daiana Antonia Tavares
Coorientadora: Tatiane Carolina Grella
Supervisor: Osmar Malaspina

1. Toxicologia de abelhas. 2. Agrotóxicos. 3. Células digestivas. I. Título.

CATARINA RIBEIRO CUNHA

Efeito de concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, isolados e combinados, na morfologia celular intestinal da abelha *Apis Mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae).

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Ecóloga.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Daiana Antonia Tavares

Dra. Tatiane Caroline Grella

Prof. Dr. Osmar Malaspina

Prof. Dra. Roberta Cornélio Ferreira Nocelli

Dra. Adna Suelen Dorigo

Aprovado em: 11 de Janeiro de 2022

Catarina Ribeiro Cunha

Assinatura do discente



Assinatura do(a) coorientador(a)

Daiana Antonia Tavares

Assinatura do(a) orientador(a)



Assinatura do(a) supervisor(a)

AGRDECIMENTOS

Agradeço à Daiana Antônia Tavares e a Tatiane Caroline Grella por toda orientação e auxílio prático e teórico para que fosse possível a realização deste trabalho.

Á Giovana Barsotti pela ajuda no laboratório, trocas de experiências e amizade, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina por ter permitido eu frequentar o Centro de Insetos Sociais.

Á UNESP pela oportunidade de realizar a graduação em Ecologia.

Á todos meus amigos que de alguma forma me ajudaram e me deram forças para chegar até aqui.

E principalmente á minha família por todo o apoio oferecido.

RESUMO

Os insetos possuem grande importância na polinização, serviço este que é essencial para a manutenção e funcionamento de ambientes agrários e naturais. Dentre os principais polinizadores estão as abelhas, que são um grupo muito diverso e fundamental nesse processo. Porém, em várias regiões do mundo vem sendo relatada a morte e o desaparecimento de colônias de *Apis mellífera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae), prejudicando assim, a sobrevivência da espécie e a estrutura dos ecossistemas. Um dos principais fatores responsáveis pelo declínio das abelhas é a utilização intensiva de agrotóxicos em cultivos agrícolas, como por exemplo o herbicida glifosato e o inseticida imidacloprido. Quando as abelhas ingerem o alimento contaminado, o primeiro órgão a entrar em contato é o intestino. Devido à necessidade de compreender quais danos esses compostos causam no intestino dessa espécie, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade de concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido no intestino, de forma isolada e associada, por testes de ingestão em abelhas forrageiras de *Apis Mellifera*. Para isso, as abelhas forrageiras foram coletadas diretamente das colônias e expostas ao inseticida e ao herbicida de forma isolada e combinada através da alimentação, após o tempo pré estabelecido para cada grupo, o intestino foi dissecado, processado e passou pela técnica de dupla coloração pela Hematoxilina e Eosina. Em seguida, foi utilizado o microscópio de luz Leica e o programa DP Controller para registrar as imagens, e posteriormente, as células do intestino foram analisadas no programa ImageJ. Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística comparativa no software RStudio. Através dos dados estatísticos finais, verificou-se que concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido de forma isolada e combinada, causaram as seguintes alterações no órgão: perda de material citoplásmico, perda de borda em escova, eliminação de células para o lúmen e células com núcleos picnóticos.

Palavras chave: células digestivas, toxicologia, agrotóxicos, morte celular.

ABSTRACT

Insects have great importance in pollination, a service that is essential for the maintenance and functioning of agricultural and natural environments. Among the main pollinators are bees, which are a very diverse and fundamental group in this process. However, in several regions of the world the death and disappearance of colonies of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) has been reported, thus jeopardizing the survival of the species and the structure of ecosystems. One of the main factors responsible for the decline of bees is the intensive use of agrochemicals in agricultural crops, such as the herbicide glyphosate and the insecticide imidacloprid. When bees ingest contaminated food, the first organ to come into contact is the intestine. Due to the need to understand what damage these compounds cause in the gut of this species, the present study aimed to evaluate the toxicity of sublethal concentrations of glyphosate herbicide and imidacloprid insecticide in the gut, in isolation and in association, by ingestion tests in *Apis Mellifera* forage bees. For this, the forage bees were collected directly from the colonies and exposed to the insecticide and herbicide in isolated and combined form through feeding, after the pre-established time for each group, the intestine was dissected, processed and passed through the technique of double staining by Hematoxylin and Eosin. Then, a Leica light microscope and the DP Controller program were used to register the images, and subsequently, the intestinal cells were analyzed in the ImageJ program. The results obtained were submitted to comparative statistical analysis in the software RStudio. Through the final statistical data, it was found that sublethal concentrations of glyphosate herbicide and imidacloprid insecticide alone and in combination caused the following changes in the organ: loss of cytoplasmic material, loss of brush border, elimination of cells into the lumen, and cells with pyknotic nuclei.

Key words: digestive cells, toxicology, pesticides, cell death.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Material biológico	11
3.2 Determinação da concentração subletal média por ingestão.....	11
3.3 Preparação do material para a técnica histológica	12
3.4 Técnica de Hematoxilina e Eosina (Junqueira; Junqueira 1983).....	12
3.5 Análise das lâminas histológicas.....	12
3.6 Atribuição dos escores	13
3.7 Análise estatística.....	14
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO.....	16
6. CONCLUSÃO.....	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1. INTRODUÇÃO

A abelha *Apis Mellifera* é um inseto muito conhecido e comum, isso devido a sua abundância e características marcantes, como a coloração e o fato de possuir ferrão (LUNARDI, 2018). Trata-se de uma espécie originária da África que espalhou-se rapidamente pela Europa e Ásia, sua introdução no Brasil ocorreu em 1839 por meio da colonização europeia (WIESE, 2005; PARKER et al., 2010). Devido as favoráveis condições florísticas e climáticas do Continente Americano, as abelhas *Apis Mellifera* tiveram uma boa adaptação e dispersaram-se ao longo de todo o continente (MELLO et al., 2003).

São consideradas abelhas eussociais devido a sua estrutura social, que é composta por:

1. Abelha rainha – conseguem viver por cerca de 5 anos e são anatomicamente maiores do que as abelhas operárias, tendo como principal responsabilidade a união e manutenção no enxame (FREE, 1980; WIESE, 2005). Realiza seu vôo nupcial nove dias após seu nascimento, em que é fecundada por vários zangões, em seguida, se a rainha for produtiva, ela consegue botar até 3.000 ovos por dia (FREITAS, 1999). 2. Zangões – são as abelhas machos, não coletam pólen ou néctar, não possuem ferrão e não produzem cera, sua única e principal função é fecundar a abelha rainha, vindo a morrer após o ato (FREITAS, 1999). 3. Operárias – são responsáveis pela maior parte das funções dentro e fora da colmeia (FREE, 1980), como limpeza, nutrição das larvas e rainhas, produção da geleia real e das ceras, construção dos favos, coleta de água, pólen, resina e néctar (WEISE, 2005; HICKMAN et al., 2010). São consideradas as principais responsáveis pelo transporte de pólen, principalmente nas culturas comerciais, pois quando assumem o papel de operárias campeiras e saem para forragear, conseqüentemente, elas também realizam a polinização (BALBUENA et al., 2015).

Na natureza existe uma troca mutualística entre as abelhas e as angiospermas, pois as abelhas precisam do pólen e do néctar para a sua sobrevivência e as angiospermas precisam do serviço de polinização das abelhas, aumentando assim, a quantidade de frutos e sementes, e colaborando para a diversidade genética (COUTO; COUTO, 2002; BREEZE et al., 2011). Além de sua essencialidade para manter o equilíbrio ecossistêmico no ambiente natural, as abelhas também são consideradas as principais polinizadoras das espécies vegetais que são cultivadas mundialmente, cerca de 73% de toda a produção mundial depende desse serviço ecossistêmico (LUNARDI, 2018).

O declínio de polinizadores em vários lugares do mundo tem aumentado a preocupação em relação as causas responsáveis por essa queda, em especial das abelhas (BIESMEIJER et al., 2006; KEVAN e VIANA, 2003). Alguns fatores são considerados como os responsáveis

pelo declínio, como por exemplo o uso exarcebado de agrotóxicos nas culturas, as mudanças climáticas e o desmatamento de seus habitats (GOMES, 2017).

O uso indiscriminado de agrotóxicos é o principal fator na causa da redução da população de abelhas, já que essas, ao visitarem as culturas são expostas aos agroquímicos de forma indireta, seja pelos resíduos que ficam no ar ou através do forrageamento ao coletarem pólen e néctar (BRITAIN e POTTS, 2011; FAIRBROTHER et al., 2014). Essa exposição pode causar efeitos letais, que conseqüentemente acarreta a diminuição do número de abelhas em campo, afetando diretamente a polinização de plantas que são dependentes desse processo (BRITAIN e POTTS, 2011). Porém, as concentrações subletais apresentam um risco tão grande quanto as concentrações letais, pois são responsáveis por alterações comportamentais, fisiológicas e morfológicas nos indivíduos expostos, que a longo prazo, irá afetar a sobrevivência dos mesmos e conseqüentemente, o desenvolvimento da colônia (BRYDEN et al., 2013).

Por conseguinte, as abelhas também podem ser expostas a combinações de dois ou mais pesticidas (ALMASRI et al., 2020). Muitos agricultores realizam a mistura de defensivos agrícolas com o objetivo de obter uma maior ação dos pesticidas e de reduzir o número de aplicações nas lavouras (PETTER et al., 2012). De acordo com Nash (1967), Marking (1977) e Calabrese (1991), essas misturas levam a interações, que são classificadas em: (a) efeito sinérgico – a fitotoxicidade total que é resultante da mistura de dois ou mais agrotóxicos é maior do que a soma dos efeitos fitotóxicos de cada defensivo aplicado isoladamente; (b) efeito aditivo – a fitotoxicidade total resultante da mistura de dois ou mais agrotóxicos é igual à soma dos efeitos fitotóxicos de cada defensivo aplicado isoladamente; e (c) efeito antagonístico – a fitotoxicidade total resultante da mistura de dois ou mais agrotóxicos é menor do que a fitotoxicidade de cada defensivo aplicado isoladamente. A mistura de agrotóxicos é amplamente utilizada no controle de pragas e ervas daninhas (COSTA et al., 2011), porém, essa combinação acaba sendo prejudicial aos organismos não-alvos (GE et al., 2014). Contudo, ainda pouco se sabe sobre os reais efeitos toxicológicos que a mistura de pesticidas podem causar nos mais diversos grupo de polinizadores (THOMPSON, 1996; PAOLIELLO; SILVA, 2004).

Dentre os agrotóxicos mais utilizados nas culturas agrárias, temos o glifosato, trata-se de um herbicida que possui alta eficiência na eliminação de ervas daninhas (RUEPPEL et al., 1977). Ele atua na mudança de determinados processos bioquímicos, como síntese de aminoácidos, já que ele inibe a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase, que promove a catalisação da condensação do fosfato piruvato e ácido chiquímico (JAWORSKI,

1972; ZABLOTOWICZ; REDDY, 2004). Trata-se de um herbicida que é encontrado em diversos agroquímicos comercializados no mercado mundial, em relação ao Brasil, esse herbicida representa cerca de 30% do volume total dos pesticidas que são utilizados anualmente (TONI et al., 2006; ZHANG et al., 2011). Devido ao seu uso prolongado, algumas espécies de plantas daninhas já criaram resistência, fazendo com que a dosagem utilizada nas culturas sejam maiores, podendo trazer sérias consequências para os mais diferentes organismos, incluindo as abelhas (TOLEDO e GUILLÉN, 2014).

Outro agrotóxico que apresenta um elevado risco para as abelhas é o inseticida imidacloprido, que é um princípio ativo neonicotinóide (DECOURTYE et al., 2003; 2004; FAUCON et al., 2005). É utilizado em diversas formulações para controle de pragas nas culturas agrícolas no mundo e no Brasil (PINHEIRO; FREITAS, 2010). De acordo com o IBGE (2015), o imidacloprido é considerado o terceiro inseticida mais consumido no Brasil. Estudos que avaliaram a toxicidade oral desse pesticida em abelhas melíferas, notaram alterações bioquímicas, deficiências no processo de aprendizagem, alterações no suprimento de oxigênio, alterações mitocondriais (CATAE; MALASPINA; ROAT, 2016), desorientação e diminuição na atividade de forrageamento (MEDRZYCKI et al., 2003; YANG et al., 2008).

De acordo com o estudo realizado por Yang e colaboradores (2008), as abelhas *A. mellifera* que foram expostas oralmente a concentrações maiores que 1200 g/L ao inseticida imidacloprido, apresentaram problemas na capacidade de localização e vôo, dessa forma, tinham uma visita tardia as fontes de alimentos e conseqüentemente, acabavam não voltando para a colônia.

Os agrotóxicos causam diversos efeitos nas abelhas, dentre eles, a morte celular é muito relatada na literatura, existem 3 tipos de morte celular, que são elas: necrose, autofagia e apoptose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). A apoptose e a autofagia são consideradas mortes celulares programadas, ou seja, trata-se de um processo fisiológico normal. A necrose é o contrário, pois ocorre quando se trata de um processo patológico, de traumatismo ou doença (ROSSI, 2011). Na apoptose ocorre o enrugamento celular e o núcleo com o citoplasma se condensam, acarretando a morte da célula, em seguida todo esse conteúdo se fragmenta em corpos apoptóticos e posteriormente são fagocitados por células vizinhas; na autofagia ocorre alterações citoplasmáticas, ou seja, as organelas se dilatam e causam a vacuolização celular; e na necrose ocorre o inchamento celular, acarretando a ruptura da membrana plasmática e o conteúdo citoplasmático é espalhado (BOWEN, I.; BOWEN, S.; JONES, 1998).

Além disso, os agrotóxicos também acarretam danos morfofisiológicos que são as consequências das alterações celulares, dessa forma, pesquisas a nível celular são de extrema

importância para avaliar os efeitos toxicológicos ocorrentes nas células e nos tecidos das abelhas (MALASPINA e SILVA-ZACARIN, 2006). O sistema digestório é o primeiro a ser atingido pelos compostos químicos, órgão este que é composto pelo intestino anterior (estomodeu), intestino médio (ventrículo) e intestino posterior (proctodeu) (SNODGRASS, 1956). O intestino médio possui origem endodérmica e é chamado de estômago funcional, pois é onde acontece a maior parte da absorção e digestão dos nutrientes, já o intestino anterior e posterior tem origem ectodérmica e possui face luminal do epitélio recoberta por cutícula (SNODGRASS, 1956; CRUZ-LANDIN, 2009; ROSSI, 2013).

O intestino médio é revestido internamente por um epitélio, que é formado por três tipos celulares, as células endócrinas, células digestivas e células regenerativas (NEVES; GITIRANA; SERRÃO, 2003; CRUZ-LANDIM, 2009). As células endócrinas produzem hormônios, as células digestivas possuem a função de sintetizar as enzimas digestivas e as células regenerativas são as células de renovação (JIMENEZ e GILLIAM, 1990; MARTINS et al., 2006) ou seja, são responsáveis por substituir as células que morrem (SILVA-ZACARIN et al., 2010).

A diminuição da população de abelhas *Apis Mellifera* trará inúmeras consequências negativas para a agricultura e para os ecossistemas, pois irá ocorrer uma redução na comunidade de plantas que dependem da polinização realizada por esses insetos, por conseguinte, também terá uma diminuição de frutos nos ambientes naturais, trazendo sérias implicações para os animais que dependem desses recursos para sobreviverem (BIESMEIJER et al., 2006; KEARNS e INOUE, 1997). Devido à toda essa problemática apresentada, o objetivo desta pesquisa foi identificar os possíveis danos causados pelo herbicida glifosato e o inseticida imidacloprido, de forma isolada e conjunta, nas células prismáticas do intestino da espécie de abelha *Apis Mellifera*, visto que, esse órgão é essencial para a manutenção e sobrevivência do indivíduo.

2. OBJETIVOS

Diante do problema exposto acima, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, de forma isolada e associada, sobre a morfologia celular do intestino das abelhas melíferas (*Apis mellifera*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

As abelhas operárias da espécie *Apis Mellifera* foram coletadas na entrada das colônias, no Apiário da Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho” – campus de Rio Claro. As abelhas foram colocadas em potes plásticos de 250 mL previamente furados para que fosse possível a entrada de oxigênio e contendo suprimento de alimento (solução de sacarose). Cada pote conteve 10 abelhas e foram usados 3 potes para cada grupo do experimento, sendo eles: controle, imidacloprido, glifosato e mistura. Posteriormente, os potes foram conduzidos em estufa para demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) com umidade relativa de 70% e temperatura a 32,1°C (condições correspondentes ao interior da colônia de abelhas melíferas).

3.2 Determinação da concentração subletal média por ingestão

Para o neonicotinoide imidacloprido, a solução mãe foi diluída em 15% de acetona e em 85% de água. Foi utilizado dados já existentes no trabalho realizado por Lima (2017), em que o valor da concentração letal média dividida por mil (CL50/1000) corresponde a concentração subletal desejada de 0,0075 ng de imidacloprido/ μ L de dieta.

O glifosato foi diluído em água, utilizando a concentração recomendada para o controle de plantas daninhas, que é cerca de 1,4 ng de glifosato/ μ L até 3,7 de glifosato/ μ L de dieta (COUTURE; LEGRIS; LANGEVIN, 1995; GIESY; DOBSON; SOLOMON, 2000; SOLOMON; THOMPSON, 2003), como a intenção foi trabalhar com concentrações subletais, a média dos valores citados acima será dividida por 1000, chegando assim, a concentração de 0,0025 ng de glifosato/ μ L, sendo essa a concentração final utilizada nos testes.

No teste de exposição combinada entre o inseticida imidacloprido e o herbicida glifosato, foram utilizados os mesmos volumes que obtivemos nas concentrações finais de forma isolada, ou seja, 0,0025 ng de glifosato/ μ L e 0,0075 ng de imidacloprido/ μ L e por fim, foi adicionado o xarope até obter a quantidade final desejada.

As concentrações subletais de forma isolada e combinada foram diluídas no alimento e oferecidas às abelhas de forma *ad libitum* durante todo o processo experimental. O alimento ficou disponível dentro dos potes plásticos por meio de um eppendorf de 1,5 mL, contendo furos na ponta e fixado na tampa do pote. O grupo controle não foi exposto aos agrotóxicos, receberam apenas o alimento puro.

3.3 Preparação do material para a técnica histológica

Após o início do experimento, foram dissecadas 5 abelhas por grupo, sendo eles: controle, imidacloprido, glifosato e mistura. A dissecação ocorreu após o valor do Tempo Letal médio (TL₅₀), estabelecido por Barsotti, Grella e Nocelli (2020), que são: imidacloprido 69 horas; glifosato 115 horas; mistura 96 horas e controle 112 horas.

Em seguida, os intestinos foram fixados em paraformoldeído 4% durante 24 horas e equilibrados em Tampão Fosfato de Sódio (PBS), pH 7,4 e 0,1M por 24 horas. Logo depois, foi seguido o protocolo padrão de inclusão em historesina Leica para as análises morfológica. Após a inclusão, o material foi cortado com espessura de 6µm realizadas em micrótomo (Leica), em diferentes profundidades do órgão. Por fim, os cortes foram dispostos em lâminas e posteriormente, passaram pelas técnicas de coloração de Hematoxilina e Eosina.

3.4 Técnica de Hematoxilina e Eosina (Junqueira; Junqueira 1983)

As lâminas foram organizadas nas cubetas e colocadas em água destilada por 1 minuto, depois coradas com hematoxilina aquosa por 10 minutos, posteriormente colocadas na água destilada durante 5 minutos e novamente lavadas em água corrente por 1 minuto. Após esses procedimentos, foram coradas com eosina por 5 minutos e por fim, lavadas em água corrente. Após a secagem, foram montadas em DPX, ou seja, meio de montagem permanente.

3.5 Análise das lâminas histológicas

As imagens foram capturadas pelo programa DP Controller em um aumento de 400x e as análises das alterações morfológicas do intestino foram realizadas no programa ImageJ. Foram analisadas 20 fotos de cada grupo (controle, glifosato, imidacloprido e mistura), totalizando no fim, 80 fotos. Sendo que em cada uma das fotos analisadas, para as alterações celulares como eliminação de células e picnose, foi realizado uma contagem das células afetadas em relação ao número total de células na imagem, e depois, o valor foi convertido em

porcentagem. Para as alterações de perda de material citoplasmático e perda de borda em escova, foram realizadas 3 medições por imagem, sendo cada uma delas em regiões distintas na mesma foto, totalizando no final, 240 medidas para cada alteração (80 fotos x 3 medições).

3.6 Atribuição dos escores

Para cada alteração morfológica identificada nas células intestinais das abelhas, foi atribuído um escore estabelecido pelo estudo de Grella et al., (2019), em que o objetivo foi classificar de forma numérica, ou seja, atribuir diferentes scores de acordo com a reversibilidade e a severidade das alterações celulares causadas pelos agrotóxicos

Foram atribuídos 3 graus de relevância para as alterações, que são elas: o grau 1, que é considerada de fácil reversão e representa uma lesão patológica com pouca relevância no órgão; o grau 2, que é possivelmente reversível em alguns casos e representa uma lesão com danos moderados no órgão; e o grau 3, que normalmente trata-se de uma lesão irreversível e considerada grave com danos parciais ou totais do órgão (GRELLA et al., 2019).

Além dos graus de alterações, o estudo citado acima também determinou valores que variam de acordo com a frequência que determinada alteração está presente no órgão. Esses valores vão de 0 a 6, em que 0 é a ausência da alteração no órgão, 2 é uma ocorrência considerada de baixa frequência, 4 é uma ocorrência considerada mediana e 6 é a presença da alta ocorrência da alteração.

Para chegar a uma atribuição numérica final de acordo com cada alteração presente no órgão, após aplicação do grau de relevância, os valores dos scores foram multiplicados pela frequência, determinando assim, um resultado preliminar de cada análise por indivíduo.

O quadro 1 apresenta as alterações celulares que o presente estudo verificou e seus respectivos scores.

Quadro 1: Escore estabelecido por Grella et al., (2019) para as alterações nas células do intestino.

ALTERAÇÃO NAS CÉLULAS DO INTESTINO	ESCORE
Eliminação de células	1
Perda de borda em escova	2
Perda de material citoplasmático	2
Picnose	3

3.7 Análise estatística

Após obter os valores do cálculo da multiplicação do escore pela frequência de ocorrência, os resultados foram submetidos a uma análise comparativa através do teste de Friedman no software RStudio.

As análises estatísticas foram feitas a partir da comparação entre todos os grupos (controle, imidacloprido, glifosato e mistura) para cada alteração separadamente. Após obter os resultados estatísticos, foi possível realizar a comparação das alterações morfológicas no intestino da abelha *Apis Mellifera* entre os diferentes grupos analisados.

4. RESULTADOS

Os resultados estatísticos obtidos demonstraram que as concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, de forma isolada e combinada, foram capazes de induzir alterações nas células intestinais das abelhas *Apis mellifera* (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios e seus respectivos desvios padrão das alterações encontradas no intestino de *Apis mellifera* forrageira exposta a imidacloprido, glifosato e sua mistura.

Grupos	Alterações			
	pmc	pbe	eCl	pic
Controle	1.1 ± 0.25 a	4.4 ± 0.39 a	2.4 ± 0.1 a	6 ± 0.0 a
Imidacloprido	3.5 ± 0.27 b	11.2 ± 0.21 b	2.2 ± 0.08 a	6 ± 0.0 a
Glifosato	2.9 ± 0.25 b	11.4 ± 0.21 b	3.6 ± 0.1 b	6.3 ± 0.17 a
Mistura	2.6 ± 0.3 b	12 ± 0.0 c	3.5 ± 0.14 b	11.1 ± 0.57 b

Perda de material citoplasmático (pmc); perda de borda em escova (pbe); eliminação de células (eCl) e picnose (pic). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas nas colunas. $p < 0,05$ para todas as análises.

Em relação a perda de material citoplasmático, podemos observar que houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos expostos. O grupo controle obteve a menor perda de material citoplasmático comparado aos grupos expostos, perda essa que é considerado basal e normal para o órgão (CRUZLANDIM, 2009). De acordo com os resultados, podemos observar que os resultados estatístico dos grupos expostos representam uma maior perda de material

citoplasmático quando comparados ao resultado do grupo controle, demonstrando que o imidacloprido e o glifosato, de forma isolada e combinada, possuem relação com o aumento dessa alteração na célula.

A borda em escova também sofreu alteração a exposição dos agrotóxicos. De acordo com os resultados, houve uma diferença estatística muito significativa entre o grupo controle e os grupos expostos. Notamos que, dentro dos grupos expostos não houve diferença estatística entre os grupos glifosato e imidacloprido, porém, quando o órgão entra em contato com a combinação de ambos agrotóxicos, vemos que a perda na borda em escova é maior do que a exposição de forma isolada.

Em relação a eliminação de células, não houve diferença estatística entre os grupos controle e imidacloprido, assim como também não houve diferença entre os grupos glifosato e mistura, porém, quando observamos os resultados, notamos que os grupos glifosato e a mistura causam maiores eliminações de células quando comparados ao grupo controle e imidacloprido.

Sobre a picnose, pode-se observar uma diferença estatística significativa entre os grupos controle, imidacloprido, glifosato quando comparados ao grupo mistura. Desta forma, notamos que a mistura dos agrotóxicos imidacloprido e glifosato pode acarretar a grande morte celular no intestino das abelhas *Apis mellifera*.

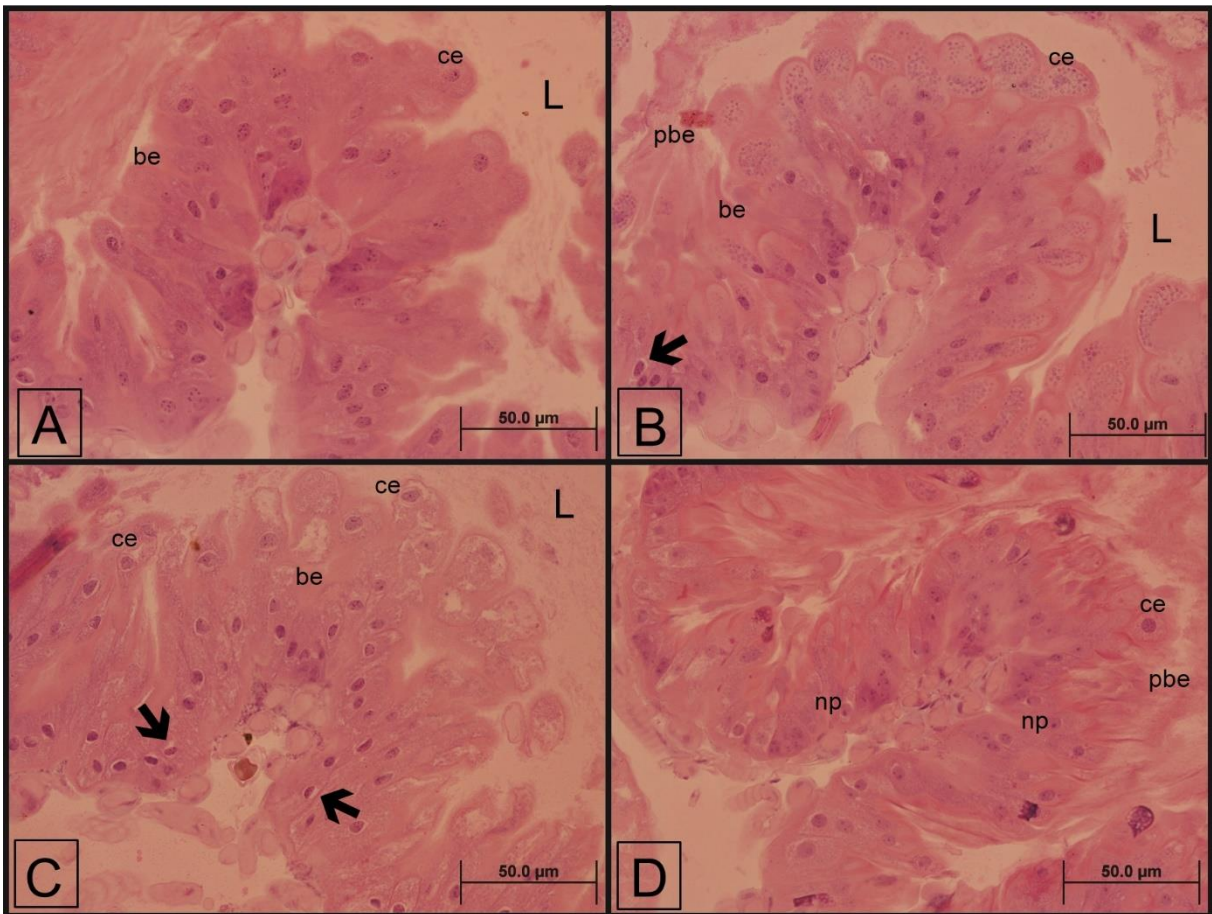


Figura 1: Intestino de *A. mellifera* nas condições experimentais expostas a concentrações subletais de glifosato (0,0025 ng de glifosato/ μ L) e imidacloprido (0,0075 ng de imidacloprido/ μ L de dieta), de forma isolada e combinada. Controle (A); Imidacloprido (B); Glifosato (C) e Mistura (D). Coloração Hematoxilina e Eosina. (ce) Célula eliminada, (L) Lúmen, (np) núcleo picnótico, (be) Borda em escova, (pbe) perda da borda em escova. A seta indica perda de material citoplasmático.

5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados do presente estudo, podemos observar que concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, de forma isolada e combinada, causam alterações morfológicas no intestino da abelha *Apis mellifera*. Os scores estabelecidos por Grella et al., (2019), nos possibilitou classificar o quanto severo é o dano no órgão e se é possível revertê-lo. A análise quantitativa nos permite uma descrição numérica dos dados, podendo assim, realizar a estatística dos mesmos e posteriormente comparar os resultados (Shamir et al., 2010; He et al., 2012).

Segundo Caetano et al., (1994), as células mais afetadas pelos inseticidas são as encontradas no sistema digestivo, visto que elas possuem um maior contato com as substâncias

e com o lúmen. A eliminação de células está entre as alterações analisadas no presente estudo, mecanismo este que é considerado natural do órgão, visto que as células digestivas apresentam um curto período de vida e são facilmente substituídas pelas células regenerativas (CRUZLANDIM, 2009). Devido a isso, o score estabelecido por Grella et al., (2019) a esse tipo de alteração foi 1, pois é considerada de fácil reversão.

De acordo com as observações e os dados estatísticos, foi possível notar um aumento na eliminação de células intestinais nos indivíduos que foram expostos ao glifosato e a mistura de glifosato com imidacloprido. A intensificação na liberação de células evidencia indícios de morte celular generalizada, acarretando uma desorganização no órgão (SOARES, 2012). O efeito negativo de agrotóxicos na eliminação de células também foi documentado por CRUZ et al., (2010), em que pesquisaram os efeitos do fipronil e do ácido bórico no intestino médio em larvas de abelhas *A. mellifera* e notaram ampla degeneração no órgão.

Apesar do presente estudo não ter obtido diferença estatística entre os grupos controle e o exposto ao imidacloprido, a pesquisa de Rossi (2011), que avaliou as consequências de doses subletais do imidacloprido nas células digestivas de abelhas *A. Mellifera*, observou um aumento significativo de células eliminadas nos grupos expostos as concentrações 0,809 ng de imidacloprido/ μ L (DL50/100) e 1,618 ng de imidacloprido/ μ L (DL50/50).

Durante períodos mais longos de exposição e dependendo da quantidade de agrotóxicos que as abelhas entram em contato, pode ocorrer uma “recuperação” das células, pois em abelhas da espécie *A. mellifera*, há um grupo de enzimas que são sintetizadas pelas células do intestino, que agem diretamente no metabolismo de desintoxicação, o que atribui às abelhas um mecanismo de tolerância a xenobióticos (JOHNSON et al., 2006). Visto que no presente estudo o tempo de exposição ao imidacloprido foi relativamente grande (69 horas) e a concentração usada foi subletal, isso pode ter acarretado uma resposta positiva das enzimas no intestino das abelhas expostas, explicando assim, o motivo pelo qual os dados estatísticos do grupo contaminado pelo imidacloprido foram próximos ao do grupo controle.

Em relação a perda de material citoplasmático, todos os grupos expostos apresentaram maior diferença estatística em relação ao grupo controle, demonstrando que, os agrotóxicos usados no presente estudo intensificam a perda de material citoplasmático nas células, alteração essa que é considerada grau 2, pois a perda progressiva de material em conjunto do aumento das áreas degradadas no citoplasma, acarreta morte celular autofágica (BOWEN, D.; BOWEN, M.; JONES 1998; BEAULATO; LOCKSHIN, 1982). O estudo realizado por Oliveira et al., (2014) também relatou grande perda de material citoplasmático em abelhas *A. mellifera* expostas ao tiametoxam, reforçando assim, que os agrotóxicos causam um aumento significativo dessa

alteração nas células intestinais.

Outra alteração observada foi a perda da borda em escova. Para essa alteração foi atribuído por Grella et al., (2019) o score 2, pois representa um dano moderado no órgão e possivelmente reversível. A borda em escova é muito importante na absorção adequada de nutrientes e na proteção de células epiteliais, visto que ela protege o epitélio contra o impacto direto do alimento (CRUZ-LANDIM, 2009). Diante disso, a diminuição na espessura da borda em escova pode acarretar problemas diretamente na absorção dos alimentos e nas células digestivas, interferindo assim, no funcionamento adequado do organismo.

Os dados no presente estudo mostram que os três grupos expostos aos agrotóxicos apresentaram perda na borda em escova quando comparados ao grupo controle, porém, a mistura do glifosato com o imidacloprido se mostrou mais prejudicial do que quando usados de forma isolada. No trabalho realizado por Grella (2017) com nanodoses do inseticida tiametoxanem em abelhas da espécie *Melipona scutellaris*, também foi observado perda da borda em escova. Além disso, os resultados apresentados por Soares et al. (2015), em que estudaram as consequências do inseticida imidacloprido na espécie de abelha *S. postica*, reforça os dados já apresentados anteriormente, visto que também foi relatado grande perda da borda em escova no intestino dos indivíduos.

A última alteração celular observada foi a picnose, alteração essa que é considerada grau 3 devido a sua alta gravidade e irreversibilidade (GRELLA et al., 2019). De acordo com Gregorc et al., (2004), a morte celular trata-se de algo natural e programado para o indivíduo em sua fase de metamorfose, porém, quando há a presença de algum agente xenobiótico no órgão, a apoptose pode aumentar significativamente e levar a uma morte em massa das células.

No presente estudo foi observado que a combinação dos agrotóxicos glifosato e imidacloprido ocasionou intensa morte celular no intestino das abelhas *A. mellifera*. Esses dados corroboram com o estudo de Soares (2012), em que as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* foram expostas ao imidacloprido através do alimento e posteriormente foi observado que o inseticida foi capaz de induzir a picnose nos indivíduos. Outro estudo que constatou dados semelhantes, foi o de Carneiro et al., (2020), em que abelhas melíferas foram expostas ao fungicida iprodione de forma aguda, ou seja, durante 24h apenas, e foi observado uma quantidade significativa de células com núcleo picnótico no intestino dos indivíduos analisados.

Um estudo realizado por Jesus (2007), em que o objetivo foi analisar as consequências do ácido bórico e do fipronil no ventrículo de indivíduos da espécie *A. mellifera*, obteve resultados parecidos com os descritos acima. As células digestivas apresentaram núcleos picnóticos, perda de material citoplasmático e alta eliminação de células no lúmen.

Semelhante ao que foi realizado no presente estudo, Orsi (2020) expôs um grupo de abelhas nativas da espécie *Scaptotrigona postica* às concentrações subletais isoladas do fungicida azoxistrobina e do inseticida dimetoato, de forma aguda e crônica. A autora descreveu que foi constatado alterações morfológicas negativas nas células intestinais das abelhas expostas aos agrotóxicos, dentre elas estão: eliminação de células no lúmen, perda de material citoplasmático, perda de borda em escova e núcleos picnóticos. Dessa forma, o resultado obtido pela autora reforça os encontrados neste estudo, visto que também foram verificadas todas essas alterações no intestino dos grupos de abelhas *A. mellifera* expostas ao herbicida glifosato e ao inseticida imidacloprido, de forma isolada e combinada.

Outro estudo muito interessante é o realizado por Motta; Raymann e Moran (2018), em que analisaram os efeitos do glifosato na microbiota intestinal de abelhas *A. mellifera*. Foi realizado a coleta de abelhas operárias adultas e recém emergidas e, posteriormente, foram expostas a 5 e 10 mg/L de glifosato misturados ao xarope de sacarose, concentração esta que é descrita como utilizada em campo, variando normalmente entre 1,4 e 7,6 mg/L (HERBERT, 2014). De acordo com as análises realizadas, foi relatado que a abundância de espécies bacterianas benéficas na microbiota intestinal diminuíram em ambas concentrações do herbicida. No caso das abelhas recém emergidas, em situação natural de campo, elas entram em contato com o agente tóxico através do alimento que é armazenado dentro da colmeia, normalmente esse alimento é contaminado por meio das abelhas operárias, pois são elas as responsáveis por realizarem a função de estocarem alimentos trazidos do campo. Devido a isso, os pesquisadores quiseram analisar as consequências do herbicida nas abelhas recém emergidas, e observaram que o glifosato interrompe o crescimento e desenvolvimento bacteriano, interferindo assim, no bom desenvolvimento da microbiota intestinal.

Visto que uma microbiota intestinal saudável é crucial para a regulação do sistema imunológico (KWONG; MORAN; 2016; CORBY-HARRIS et al., 2014), processamento dos alimentos (MUKHERJEE; 2009; THOMPSON et al., 2014) e defesa contra patógenos (KOCH; SCHMID-HEMPEL; 2011; LOZUPONE; 2005), quando ocorre da composição ser afetada, as perturbações nesse sistema podem acarretar consequências negativas para a saúde das abelhas, pois a suscetibilidade à invasão de patógenos aumenta (RAYMANN; SHAFFER; MORAN; 2017).

6. CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, é possível concluir que concentrações subletais do herbicida glifosato e do inseticida imidacloprido, de forma isolada e combinada, acarretam alterações morfológicas prejudiciais no intestino das abelhas *Apis Mellifera*. Conseqüentemente, essas alterações morfológicas podem desencadear alterações fisiológicas no órgão e afetar a saúde dos indivíduos, comprometendo posteriormente, a eficácia da polinização.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMASRI, H., et al. Mixtures of an insecticide, a fungicide and a herbicide induce high toxicities and systemic physiological disturbances in winter *Apis mellifera* honey bees. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 203, p. 111013, 2020.
- BALBUENA, M. S., et al. Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 17, p. 2799-2805, 2015.
- BALIEIRA, K. V. B. Efeito oxidante do imidacloprido em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e potencial ação antioxidante da cafeína. 2017.
- BARSOITI, G.; GRELLA, T. C.; NOCELLI, R. C. F. Determinação da TL50 de agrotóxicos para *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera, Apidae). **XXVII Congresso de Iniciação Científica e XII Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação**, 2021.
- BEAULATON, J.; LOCKSHIN, R.A. The relation of programmed cell death to development and reproduction. Comparative studies and an attempt at classification. **International Review of Cytology**, New York, v. 79, p. 215-235, 1982.
- BIESMEIJER, J. C. et al. Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 351-354, 2006.
- BOWEN, I. D.; BOWEN, S. M.; JONES, A. H. **Mitosis and Apoptosis: matters of life and death**. New York: Chapman & Hall, p.174, 1998.
- BREEZE, T. D. et al. Pollination services in the UK: How important are honeybees? **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 142, n. 3-4, p. 137-143, 2011.
- BRITTAIN, C.; POTTS, S. G. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. **Basic and Applied Ecology**, v. 12, n. 4, p. 321-331, 2011.
- BRYDEN, J. et al. Chronic sublethal stress causes bee colony failure. **Ecology letters**, v. 16, n. 12, p. 1463-1469, 2013.
- CAETANO, F. H.; TORRES, JR. A. H.; CAMARGO-MATHIAS, A. M. I.; TOMAKE, E. M. Apocrine secretion in the ant, *Pachycondyla striata*, ventriculus (Formicidae: Ponerinae). **Cytobios**, Cambridge, v. 80, p. 235-242, 1994.
- CALABRESE, E. J. Multiple chemical interactions. **Lewis Publishers**, 1991. p. 13.
- CARNEIRO, L. S. et al. The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 189, p. 109991, 2020.
- CATAE, A. F; MALASPINA, O; ROAT, T. C. **Alterações no cérebro e no ventrículo de abelhas *Apis Mellifera* expostas ao imidacloprido**. 2016. 21 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

CONSTANZA, R. La economía ecológica de la sostenibilidad: Invertir en capital natural. In: **Medio ambiente y desarrollo sostenible: Más allá del Informe Brundtland**. Trotta, 1997. p. 103-114.

CORBY-HARRIS, V. et al. Origin and effect of Alpha 2.2 Acetobacteraceae in honey bee larvae and description of *Parasaccharibacter apium* gen. nov., sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 24, p. 7460-7472, 2014.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: Funep, 2006.

COUTURE, G.; LEGRIS, J.; LANGEVIN, R. Evaluation des impacts du glyphosate utilisé dans le milieu forestier. **Ministère des Ressources Naturelles, Direction de l'Environnement forestier, Service du suivi environnemental, Charlesbourg, Québec, Canada**, 1995.

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**, Dordrecht, v. 26, p. 165- 176, 2010.

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

ROSSI, C. A. ; et al. Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy research and technique**, v. 76, n. 5, p. 552-558, 2013.

ROSSI, C. A. **Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de Malpighi de *Apis mellifera* africanizada**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia celular e molecular) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro, p. 104. 2011.

DECOURTYE, A.; et al. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 78, n. 2, p. 83-92, 2004.

FAIRBROTHER, A. Risks of neonicotinoid insecticides to honeybees. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 33, n. 4, p. 719-731, 2014.

FAUCON, J. P. et al. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 61, n. 2, p. 111-125, 2005.

FREE, J. B. **A organização social das abelhas (Pais)**. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1980. 190 p

FREITAS, B. M. A vida das abelhas. **Craveiro & Craveiro-UFC, Fortaleza CE**, 1999.

GE, H. et al. Balance between herbicidal activity and toxicity effect: a case study of the joint effects of triazine and phenylurea herbicides on *Selenastrum capricornutum* and *Photobacterium phosphoreum*. **Aquatic toxicology**, v.150, p. 165-174, 2014.

GOMES, I. N. **Bioensaios em laboratório indicam efeitos deletérios de agrotóxicos sobre as abelhas *Melipona capixaba* e *Apis mellifera***. Dissertação para o Programa de Pós-Graduação em Manejo e Conservação de Ecossistemas Naturais e Agrários - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, p. 59. 2017.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup. **Herbicide Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35–120, 2000.

GREGORC, A; POGACNIK, A; BOWEN, I. D. Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid. **Apidologie**, Versailles, v. 35, p.453–460, 2004.

GRELLA, T. C. **Efeitos de nanodoses do inseticida tiametoxam para a abelha *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 1 (Hymenoptera, Apidae): da absorção ao órgão alvo**. Dissertação (Pós Graduação em agricultura e ambiente) – Centro de Ciências Agrárias do Câmpus de Araras, Universidade Federal de São Carlos. Araras, p. 60. 2017.

GRELLA, T. C. et al. Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. **Chemosphere**, v. 236, p. 124255, 2019.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and tissue research**, v. 301, n. 1, p. 5-17, 2000.

HE, L. et al. Histology image analysis for carcinoma detection and grading. **Computer methods and programs in biomedicine**, v. 107, n. 3, p. 538-556, 2012.

HERBERT, L. T. et al. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 19, p. 3457-3464, 2014.

HICKMAN JUNIOR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Integrated principles of Zoology**. 15. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2010. 842 p.

IBGE (Org.). **Indicadores de desenvolvimento sustentável: uso de agrotóxicos**. 10. ed. Rio Claro: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2015

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. Bees as pollinators in Brazil: assessing the status and suggesting best practices. Proceedings of the Workshop on São Paulo Declaration on Pollinators plus 5 Forum, São Paulo, Brazil, 27-31 October 2003. **Holos, Editora**, 2006.

JAWORSKI, E. G. Mode of action of N-phosphonomethylglycine. Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, p. 1195–1198, 1972.

JESUS, D. **Análise morfológica dos túbulos de Malpighi e dos ventrículos de operárias recém-emergidas de *Apis mellifera* (Hymenoptera:Apinae) tratadas com fipronil e ácido bórico.** Trabalho de conclusão do curso (Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

JIMENEZ, D. R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honey bee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nonspecific esterase. **Cell and Tissue Research**, v. 261, n. 3, p. 431-443, 1990.

JOHNSON, R.M.; WEN, Z.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Mediation of pyrethroid insecticide toxicity to honey bees (Hymenoptera: Apidae) by cytochrome P450 monooxygenases. **Journal of Economy Entomology**, Lanham, v.99, n. 4, p. 1046-50, 2006.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W. Pollinators, flowering plants, and conservation biology. **Bioscience**, v. 47, n. 5, p. 297-307, 1997.

KEVAN, P.G. & VIANA, B.F. The global decline of pollination services. **Biodiversity Journal of Life on Earth.**, 494: 03-08. 2003.

KOCH, H.; SCHMID-HEMPEL, P. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 48, p. 19288-19292, 2011.

KWONG, W. K.; MORAN, N. A. *Apibacter adventoris* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from honey bees. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1323, 2016.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228-8235, 2005.

LUNARDI, J. S. **Efeito de doses letais e subletais de herbicidas sobre a mortalidade e alterações comportamentais de *Apis mellifera* L.** Dissertação (Ciências Biológicas - Área de concentração: Zoologia) Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Câmpus de Botucatu, 2018.

MALASPINA, O.; DA SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 0-0, 2017.

MARKING, L. L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. In: **Aquatic toxicology and hazard evaluation**. ASTM International, 1977.

MARTINS, G. F. et al. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bees. **Micron**, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2006.

MEDRZYCKI, P. et al. Effects of imidacloprid administered in sub-lethal doses on honey bee behaviour. Laboratory tests. **Bulletin of Insectology**, v. 56, p. 59-62, 2003.

MELLO, M. H. S. H.; SILVA, E. A.; NATAL, D. Abelhas africanizadas em área metropolitana do Brasil: abrigos e influências climáticas. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 237-241, 2003.

MOTTA, E. V; RAYMANN, K.; MORAN, N. A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 41, p. 10305-10310, 2018.

MUKHERJEE, I. Determination of pesticide residues in honey samples. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 83, n. 6, p. 818-821, 2009.

NASH, R. G. Phytotoxic pesticide interactions in soil. **Agronomy Journal**, v. 59, n. 3, p. 227-230, 1967.

NEVES, C. A.; GITIRANA, L. D. B.; SERRÃO, J. E. Ultrastructural Study of the Metamorphosis in the Midgut of *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Apidae, Meliponini) Worker. **Sociobiology**, v. 41, n. January, p. 443–459, 2003.

OLIVEIRA, R. A. et al. Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Environmental toxicology**, v. 29, n. 10, p. 1122-1133, 2014.

ORSI, L. **Análise dos efeitos de agrotóxicos sobre a espécie *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807**. Dissertação (Pós Graduação em agricultura e ambiente) – Centro de Ciências Agrárias do Câmpus de Araras, Universidade Federal de São Carlos, 2020.

PAOLIELLO, M. M. B.; SILVA, E. S. Toxicodinâmica. In: **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: Rima, 2004. p. 93–114.

PARKER, R. et al. Ecological adaptation of diverse honey bee (*Apis mellifera*) populations. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11096, 2010.

PETTER, F. A. et al. Incompatibilidade física de misturas entre herbicidas e inseticidas. **Planta Daninha**, v. 30, n. 2, p. 449-457, 2012.

PINHEIRO, J. N.; FREITAS, B. M. Efeitos letais dos pesticidas agrícolas sobre polinizadores e perspectivas de manejo para os agroecossistemas brasileiros. **CEP**, v. 60021, p. 970, 2010.

RAYMANN, K.; SHAFFER, Z.; MORAN, N. A. Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. **PLoS biology**, v. 15, n. 3, p. e2001861, 2017.

RICKETTS, T. H. et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? **Ecology letters**, v. 11, n. 5, p. 499-515, 2008.

RUEPPEL, M. L. et al. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 25, n. 3, p. 517-528, 1977.

RUIZ-TOLEDO, J.; SÁNCHEZ-GUILLÉN, D. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Acta zoológica mexicana**, v. 30, n. 2, p. 408-413, 2014.

SILVA-ZACARIN, E. C. M.; FERREIRA, R. A. C.; NOCELLI, R. C. F.; ROAT, T. C.; PALMA, M. S.; MALASPINA, O. Structure and function of the intestine and Malpighian tubules: from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. Chapter in *Social Insects: Structure, Function and Behavior*. **Nova Science Publishers, USA**, 27p., 2010.

SHAMIR, L. et al. Pattern recognition software and techniques for biological image analysis. **PLoS computational biology**, v. 6, n. 11, p. e1000974, 2010.

SOARES, H. M. **Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia celular e molecular) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro, p. 88. 2012.

SOARES, H. M. **Efeitos combinados de *Nosema ceranae* e do inseticida imidacloprido sobre abelhas *Apis mellifera* africanizada**. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia celular e molecular) - Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Rio Claro, p. 146. 2017.

SOARES, H. M. et al. Toxicity of imidacloprid to the stingless bee *Scaptotrigona postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 94, n. 6, p. 675-680, 2015.

SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. **J. Toxicol. Environ. Health**, p. 289–324, 2003.

SNODGRASS, R.E. *Anatomy and Physiology of the Honeybees*. **New York: Comstock Publishing Ass.** 327p. 1956.

TOLEDO, R. J.; GUILLÉN, S. D. Effect of the concentration of glyphosate present in body waters near transgenic soybean fields on the honeybee *Apis mellifera*, and the stingless bee *Tetragonisca angustula*. **Acta Zoológica Mexicana**, v. 30, p. 408–413, 2014.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 829, 2006.

THOMPSON, H. M. et al. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (*Apis mellifera*) development using glyphosate as an example. **Integrated environmental assessment and management**, v. 10, n. 3, p. 463-470, 2014.

THOMPSON, H. M. Interactions between pesticides; a review of reported effects and their implications for wildlife risk assessment. **Ecotoxicology**, v.5, n. 2, p. 59-81, 1996.

WIESE, H. **Apicultura: novos tempos. 2. ed.** Guaíba: Agrolivros, 2005. 378 p.

YANG, E. C. et al. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal of economic entomology**, v. 101, n. 6, p. 1743-1748, 2008.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate on the *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 825–831, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>>.

ZHANG, W. J.; JIANG, F. B.; OU, J. F. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v. 1, n. 2, p. 125, 201