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

Avaliação morfológica e bioquímica em abelhas recém emergidas da espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille 1807 (Hymenoptera, Apidae), expostas a clotianidina durante a fase larval

Isabella Fernanda Camargo

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Rio Claro - SP
2022

Isabella Fernanda Camargo

Avaliação morfológica e bioquímica em abelhas recém emergidas da espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille 1807 (Hymenoptera, Apidae), expostas a clotianidina durante a fase larval

Orientadora: Prof^a. Dr^a Roberta C. Ferreira Nocelli

Coorientadora: Dr^a Annelise de Souza Rosa-Fontana

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Rio Claro - SP
2022

C172a Camargo, Isabella Fernanda
Avaliação morfológica e bioquímica em abelhas recém emergidas da espécie
Scaptotrigona postica, Latreille 1807 (Hymenoptera, Apidae), expostas a
clotianidina durante a fase larval / Isabella Fernanda Camargo. -- Rio Claro,
2022
89 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto
de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Roberta Cornélio Ferreira Nocelli
Coorientadora: Annelise de Souza Rosa-Fontana

1. Abelhas nativas. 2. Agrotóxico. 3. Criação in vitro. 4. Análises morfológicas
e bioquímicas. 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 DISSERTAÇÃO: Avaliação morfológica e bioquímica em abelhas recém emergidas da espécie *Scaptotrigona postica*, Latreille 1807 (Hymenoptera, Apidae), expostas a clotianidina durante a fase larval

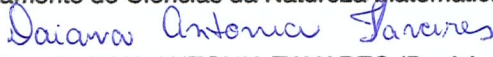
AUTORA: ISABELLA FERNANDA CAMARGO

ORIENTADORA: ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI

COORIENTADORA: ANNELISE DE SOUZA ROSA FONTANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI (Participação Presencial)
Departamento de Ciências da Natureza Matemática e Educação / UFSCar - Araras


Profa. Dra. DAIANA ANTONIA TAVARES (Participação Presencial)
Pós-Doutoranda do Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro


Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Rio Claro, 26 de agosto de 2022

À minha avó materna, Maria Fátima (in memoriam), que sempre teve muito orgulho de mim e adorava perguntar sobre a minha pesquisa com as abelhas....

AGRADECIMENTOS

Para mim, a conclusão deste trabalho foi muito mais além do que qualquer realização profissional. Não me tornou apenas uma cientista, mas me ensinou o significado da palavra superação, como ser humano que possui limitações, dificuldades e que pode superar qualquer barreira.

Além dos ofícios desenvolvidos como pesquisadora, dar andamento em uma pesquisa durante uma pandemia e em tempos sombrios para a ciência, foi um trabalho árduo, mas extremamente gratificante ao terminar. As relações humanas construídas ao decorrer deste trabalho me mantiveram de pé quando dias difíceis se fizeram presentes, e quando pessoas amadas foram brilhar no céu (mas também teve espaço para muito aprendizado e momentos felizes).

Assim sendo, sou imensamente grata pela oportunidade de realizar esse mestrado e concretizar mais um sonho na minha carreira. Com isso, deixo o meu agradecimento especial a todos aqueles que fizeram parte desta etapa na minha vida:

A Deus, por ter me fortalecido nos momentos mais difíceis, e por ser meu alicerce.

A minha família, em especial aos meus pais, aos meus irmãos, as minhas avós, principalmente a Maria Fátima (in memoriam), ao meu tio Célio e ao Davi Alcantara, por toda paciência, apoio e companheirismo.

À professora Dra Roberta Cornélio Ferreira Nocelli, pela orientação, paciência, pela empatia e compreensão, pelo auxílio desde o meu segundo ano de graduação e, principalmente, por ter me inspirado a ser cientista.

À professora Dr. Annelise de Souza Rosa-Fontana, pela coorientação, pelas conversas tranquilizadoras, por todo apoio durante os trabalhos que desenvolvi, pelas risadas e especialmente pela paciência também.

Ao professor Dr. Osmar Malaspina, por ter me recebido de portas abertas e me assegurado todo suporte técnico para desenvolver este trabalho.

À Tatiane Caroline Grella, por compartilhar o seu conhecimento sempre que possível, por me ajudar e me socorrer inúmeras vezes respondendo as minhas dúvidas e, principalmente, por todo o auxílio que me deu para que eu desenvolvesse este trabalho.

À Rafaela Tadei, pela disponibilidade para me auxiliar com os scripts do R e por todos os ensinamentos de estatística.

Ao Caio Eduardo da Costa Domingues, pela amizade, paciência e por todos os ensinamentos e conselhos, mesmo do outro lado do mundo.

À Geovana Maloni, pelo aprendizado compartilhado, pela companhia durante a produção de soluções padrões e demais técnicas para a realização deste trabalho.

À Adna Dorigo, por ter feito parte da minha trajetória e por ter me auxiliado milhares de vezes sempre que precisei.

Aos membros do LECA, que foram essenciais ao meu aprendizado e para o desenvolvimento deste trabalho, especialmente a Daiana, pelos ensinamentos de enzimática.

A seção técnica de pós-graduação do IB, especialmente ao Felipe e a Eliana, por todo o profissionalismo e paciência para me responder sempre que possível, me auxiliando com todas as questões burocráticas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processos: 2017/21097-3; 2019/20109-3) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro à pesquisa realizada (Processo: 400540/2018-5).

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

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho e não foram mencionados aqui.

“A vida não é tanto sobre o que você conquista, mas sobre o que você supera”.

- Robin Roberts

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL | 16 |
| 2. OBJETIVO GERAL E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO | 24 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 25 |
| 4.CAPÍTULO 1 | 32 |
| 4.1. INTRODUÇÃO..... | 32 |
| 4.2. OBJETIVO GERAL | 34 |
| 4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 35 |
| 4.4. MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 4.5. RESULTADOS..... | 39 |
| 4.6. DISCUSSÃO | 46 |
| 4.7. CONCLUSÃO..... | 50 |
| 4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 51 |
| 5.CAPÍTULO 2 | 55 |
| 5.1. INTRODUÇÃO..... | 55 |
| 5.2. OBJETIVO GERAL | 60 |
| 5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 60 |
| 5.4. MATERIAL E MÉTODOS | 60 |
| 5.5. RESULTADOS..... | 68 |
| 5.6. DISCUSSÃO | 76 |
| 5.7. CONCLUSÃO..... | 82 |
| 5.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| 6. CONCLUSÕES GERAIS | 91 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação das estruturas químicas dos neonicotinoides utilizados no Brasil, com ênfase na clotianidina.....**Pág.19**
- Figura 2. Representação das placas de criação in vitro dispostas em estufa incubadora B.O.D, a 28,7 C^o e umidade de 95±5% nos primeiros dias.....**Pág.38**
- Figura 3. Progressão do desenvolvimento larval de *S. postica*.....**Pág.40**
- Figura 4. Fases de desenvolvimento no período pupal.....**Pág.40**
- Figura 5. Tempo em que os indivíduos atingiram o 5^a instar larval.....**Pág.42**
- Figura 6. Tempo em que os indivíduos defecaram.....**Pág.43**
- Figura 7. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho branco.....**Pág.43**
- Figura 8. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho rosa.....**Pág.44**
- Figura 9. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho marrom.....**Pág.44**
- Figura 10. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho preto.....**Pág.45**
- Figura 11. Tempo em que os indivíduos emergiram.....**Pág.45**
- Figura 12. Abelhas jovens emergindo das células de cria artificiais.....**Pág.63**
- Figura 13. Representação dos órgãos dissecados e fixados diretamente em paraformaldeído 4%..... **Pág.64**
- Figura 14. Fotomicrografias das estruturas de tecido e alterações no intestino médio de *S. postica*..... **Pág.71**

| | |
|--|---------------|
| Figura 15. Fotomicrografias das estruturas de tecido e alterações nos túbulos de Malpighi de <i>S. postica</i> | Pág.72 |
| Figura 16. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da carboxilesterase 3 em abelhas <i>S. postica</i> | Pág.74 |
| Figura 17. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glutaciona-S-transferase em abelhas <i>S. postica</i> | Pág.74 |
| Figura 18. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase em abelhas <i>S. postica</i> | Pág.75 |
| Figura 19. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glutaciona peroxidase em abelhas <i>S. postica</i> | Pág.75 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|---------------|
| Tabela 1. Mortalidade da fase larval, taxa de pupação e taxa de emergência com relação a larvas e pupas (média \pm erro padrão) de <i>S. postica</i> | Pág.41 |
| Tabela 2: Alterações e pontuações atribuídas a cada um dos órgãos analisados..... | Pág.66 |
| Tabela 3. Valores da média e erro padrão das alterações encontradas no intestino médio de recém emergidas expostas a clotianidina..... | Pág.69 |
| Tabela 4. Valores da média e erro padrão das alterações encontradas nos túbulos de Malpighi de recém emergidas expostas a clotianidina..... | Pág.69 |

RESUMO

O Brasil é o país com maior biodiversidade de abelhas sem ferrão do mundo. Dentre as espécies, *Scaptotrigona postica* desempenha papel fundamental nos serviços de polinização de plantas nativas e cultivadas. No entanto, a saúde das populações desses polinizadores está sendo ameaçada devido a múltiplos fatores, dentre eles, o uso intensivo de agrotóxicos. Esses compostos químicos chegam à colmeia por meio de abelhas forrageiras e, uma vez lá, podem ser ingeridos pelas larvas durante a alimentação. No Brasil são utilizados diferentes grupos de agrotóxicos, entre eles a clotianidina, um ingrediente sistêmico, cujos efeitos são desconhecidos em larvas e adultos de abelhas *S. postica*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo compreender os possíveis impactos da clotianidina por meio da: (I) investigação dos efeitos de concentrações realísticas de campo, na sobrevivência e desenvolvimento de larvas e adultos de abelhas *S. postica*; (II) avaliação da toxicidade deste inseticida na morfologia de tecidos de órgãos de metabolização de substâncias (intestino e túbulos de Malpighi) de recém emergidas; e (III) análise da atividade de enzimas relacionadas a desintoxicação (Carboxilesterase 3 – CaEs-3 e Glutathione-S-transferase - GST) e enzimas antioxidantes (Glicose-6-fosfato desidrogenase – G6PD e Glutathione peroxidase - GPx), nos órgãos supracitados de abelhas recém emergidas. Para que os objetivos fossem alcançados, foram realizadas sucessivas diluições no alimento para atingir as concentrações de clotianidina a serem oferecidas às larvas: 1 ng i.a./ μ L (concentração de campo) e 0,1 ng i.a./ μ L (concentração de campo/10), o alimento puro foi oferecido ao grupo controle. Após a distribuição do alimento (25 μ L/larva) em placas de acrílico, larvas de primeiro instar foram coletadas e transferidas. Para os bioensaios in vitro, os efeitos foram observados de acordo com a progressão das fases de desenvolvimento: 5ª instar larval; defecação; taxa de mortalidade; taxa de pupação; taxa de emergência; mudança na coloração de olhos das pupas e; tempo em cada fase de desenvolvimento. Para as análises de alterações morfológicas, lâminas contendo secções dos órgãos sob coloração de hematoxilina e eosina foram analisadas. Para cada alteração observada foi levado em consideração o índice de relevância dos danos patológicos nos órgãos. Já para as análises de modulação da atividade das enzimas, os grupos expostos foram individualmente comparados com o grupo controle e diferenças significativas foram consideradas. Os dados obtidos foram submetidos a análises estatísticas no software RStudio. Os resultados

demonstraram que a clotianidina afetou significativamente as taxas de sobrevivência, pupação e emergência das abelhas em ambos os grupos expostos, quando comparados ao controle. O tempo em cada fase de desenvolvimento apresentou significância estatística para o 5ª instar larval e defecação. Não houve diferença no tempo entre os grupos no período pupal, apenas em pupa de olho marrom, demonstrando que a clotianidina foi mais tóxica no período larval do que pupal. Os resultados das alterações morfológicas demonstraram que a clotianidina danificou severamente os órgãos analisados nos grupos expostos. Foram observadas alterações como perda de material citoplasmático; perda de borda em escova; aumento da eliminação de células para o lúmen; perda de ninhos de células regenerativas; inchaço celular e picnose. Já com relação aos resultados de atividade enzimática, a concentração de campo de clotianidina modulou diferencialmente a atividade das enzimas CaEs-3, GST e G6PD, com exceção da GPx. Os resultados obtidos são inéditos e contribuem para o desenvolvimento de medidas protetivas para a conservação da *S. postica*, uma vez que este estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da exposição larval a clotianidina para essa espécie de abelha. Desse modo, esse trabalho fornece dados relevantes a serem incluídos nas investigações do IBAMA e nos esquemas de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos para abelhas sem ferrão.

Palavras-chave: Neonicotinoide, meliponíneos, criação *in vitro*, danos morfológicos, atividade enzimática.

ABSTRACT

Brazil is the country with the greatest biodiversity of stingless bees in the world. Among the species, *Scaptotrigona postica* plays a fundamental role in the pollination services of native and cultivated plants. However, the health of populations of these pollinators is being threatened due to multiple factors, among them, the intensive use of pesticides. These chemical compounds reach the hive through forager bees and, once there, can be ingested by the larvae during feeding. In Brazil, different groups of pesticides are used, including clothianidin, a systemic ingredient whose effects are unknown in larvae and adults of *S. postica* bees. Thus, the present study aimed to understand the possible impacts of clothianidin through: (I) investigation of the effects of realistic field concentrations on the survival and development of larvae and adults of *S. postica* bees; (II) evaluation of the toxicity of this insecticide in the morphology of tissues of substances metabolizing organs (intestine and Malpighian tubules) of newly emerged; and (III) analysis of the activity of detoxification-related enzymes (Carboxylesterase 3 - CaEs-3 and Glutathione-S-transferase - GST) and antioxidant enzymes (Glucose-6-phosphate dehydrogenase - G6PD and Glutathione peroxidase - GPx) in aforementioned organs of newly emerged bees. To achieve the objectives, successive dilutions were carried out in the food to reach the concentrations of clothianidin to be offered to the larvae: 1 ng a.i./ μ L (field concentration) and 0.1 ng a.i./ μ L (field concentration/10), pure food was offered to the control group. After distributing food (25 μ L/larva) on acrylic plates, first instar larvae were collected and transferred. For the in vitro bioassays, the effects were observed according to the progression of the developmental stages: 5th larval instar; defecation; mortality rate; pupation rate; emergency fee; change in pupae eye color and time at each stage of development. For the analysis of morphological changes, slides containing sections of the organs stained with hematoxylin and eosin were analyzed. For each observed alteration, the relevance index of pathological damage to the organs was considered. For the analysis of enzyme activity modulation, the exposed groups were individually compared with the control group and significant differences were considered. The data obtained were submitted to statistical analysis in the RStudio software. The results showed that clothianidin significantly affected the survival, pupation and emergence rates of bees in both exposed groups when compared to the control. The time in each developmental stage was statistically significant for the 5th larval instar and defecation. There was no difference in time between groups in the pupal period,

only in brown-eyed pupae, demonstrating that clothianidin was more toxic in the larval period than in the pupal period. The results of the morphological alterations showed that clothianidin severely damaged the organs analyzed in the exposed groups. Changes such as loss of cytoplasmic material were observed; brush edge loss; increased clearance of cells into the lumen; loss of regenerative cell nests; cellular swelling and pyknosis. Regarding the enzymatic activity results, the clothianidin field concentration differentially modulated the activity of the CaEs-3, GST and G6PD enzymes, except for GPx. The results obtained are unprecedented and contribute to the development of protective measures for the conservation of *S. postica*, since this study is the first to assess the effects of larval exposure to clothianidin for this bee species. Thus, this work provides relevant data to be included in IBAMA investigations and in the environmental risk assessment schemes of pesticides for stingless bees.

Keywords: Neonicotinoid; meliponines; *in vitro* creation; morfological damage; enzymatic activity.

1.INTRODUÇÃO GERAL

A perpetuação da vida no planeta carece de alguns processos biológicos essenciais. Esses processos têm elevado grau de importância, uma vez que auxiliam a manter a diversidade, abundância e a atividade de diferentes tipos de organismos nos ecossistemas. Um ecossistema é um complexo dinâmico de comunidades de plantas, animais, micro-organismos e o ambiente não vivo interagindo como uma unidade funcional. Os seres humanos são parte integrante dos ecossistemas. Já os serviços ecossistêmicos são benefícios que os seres humanos obtêm dos ecossistemas. A polinização é um exemplo claro de um serviço ecossistêmico regulatório (DAILY, 1997; Millennium Ecosystem Assessment 2003; 2005).

Os serviços de polinização integram esses processos biológicos indispensáveis, visto que desempenham um papel fundamental na manutenção e no equilíbrio da vida na Terra. A eficiência desses serviços na reprodução da maioria das espécies vegetais impacta, diretamente, na formação de frutos e sementes e promove a variabilidade genética em decorrência do cruzamento das plantas com flores. Estima-se que cerca de 75% das principais fontes de alimento no Brasil, e quase 90% das angiospermas no mundo, dependem, em algum grau, da transferência de pólen por animais (HEITHAUS, 1974; KEVAN; VIANA, 2003; IMPERATRIZ-FONSECA, 2004; IPBES, 2017; BPBES, 2019).

Dentre os agentes polinizadores, as abelhas são as mais frequentes devido a sua abundância e dependência das flores para alimentação, sendo as mais reconhecidas e principais responsáveis por polinizar plantas nativas e cultivadas. O serviço prestado por esses insetos auxilia no funcionamento contínuo dos ecossistemas naturais e agroecossistemas, tem papel imprescindível na perpetuação da fauna e flora e traz inúmeros benefícios para a sociedade (WRATTEN *et al.*, 2012; KLEIN *et al.*, 2007; IMPERATRIZ-FONSECA; JOLY, 2017; IPBES, 2017; ARIOLI *et al.*, 2017; BPBES, 2019).

Além da relevância ecológica, a abundância de abelhas em paisagens agrícolas promove maior rendimento na produção de diversas culturas, tais como o girassol, morango e melão (ROUBIK, 2018; PERROT *et al.*, 2019). Giannini *et al.* (2015) revisaram a dependência de cultivos por abelhas no Brasil, e de 141 culturas

85 foram identificadas como dependentes desses agentes tão importantes. Além disso, o valor anual dos serviços de polinização na produção de alimentos é equivalente a R\$43 bilhões na economia brasileira, sendo a soja, café, maçã e laranja os detentores dos maiores valores anuais de produção (BPBES, 2019).

O Brasil abriga mais de 2.500 espécies de abelhas já classificadas e distribuídas em cinco famílias. A família Apidae inclui a fauna de abelhas sem ferrão, grupo de hábito social com maior diversidade em território brasileiro. São encontradas aproximadamente 244 espécies descritas, pertencentes a 29 gêneros, e cerca de 87 são endêmicas no Brasil, correspondendo a 20% das espécies estimadas de abelhas sem ferrão neotropicais (SILVA *et al.*, 2014; PEDRO, 2014). As mais reconhecidas pertencem a tribo Meliponini e, assim como as abelhas de gênero *Apis*, possuem organização eussocial. No entanto, existem muitas lacunas de conhecimento sobre a maioria das espécies não-*Apis* que ainda precisam ser preenchidas (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004; MICHENER, 2013; IBAMA, 2017). Em virtude dessa escassez de dados, salienta-se a importância de estudos com espécies nativas sem ferrão.

Dentre essas espécies, *Scaptotrigona postica* (LATREILLE, 1807) (Hymenoptera: Apidae), pertence ao grupo de meliponíneos que vivem em ocos de árvores. Conhecida como abelha Mandaguari, possui ampla distribuição geográfica por todo o território brasileiro, incluindo o Estado de São Paulo. (KERR, *et al.*, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; CAMARGO; PEDRO, 2013). A espécie em questão, realiza um importante papel na polinização de plantas nativas do Brasil, como por exemplo, a *Campomanesia pubescens*, conhecida popularmente como gabioba. O fruto produzido pela planta é o terceiro alimento mais abundante e o segundo mais ocorrente na alimentação do lobo-guará. Além desse fruto, *S. postica* também é responsável por polinizar umbu, juá-fruta, murta e café (JUNIOR MOTTA, 2000; MICHALSKI; BARBOLA; LUZ, 2013; BPBES, 2019).

Devido a relevância desses polinizadores para a diversidade de plantas e para a produção de alimentos no Brasil, esses insetos vêm sendo cada vez mais reconhecidos e destacados, principalmente em estudos que avaliam os impactos do crescimento e da intensificação agrícola no país. Tais práticas promovem a fragmentação de habitats naturais, a perda da flora nativa e o aumento no uso de agrotóxicos. Em vista disso, as fontes de alimento e os locais para nidificação das abelhas são altamente afetados, prejudicando a riqueza de algumas espécies

(IMPERATRIZ-FONSECA, 2004; CEPEA, 2014; GOULSON *et al.*, 2015; KLEIN *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, a diversidade e a saúde das populações de abelhas estão sendo ameaçadas, o que implica em múltiplos impactos, tanto ecológicos quanto econômicos (KREMEN, 2004). Uma das possíveis causas para o declínio de abelhas é o uso intensivo de agrotóxicos (BLACQUIÈRE *et al.*, 2012). Uma vez que ao realizarem os serviços de polinização, especialmente em áreas agrícolas, esses insetos estão suscetíveis a ação de substâncias amplamente utilizadas para o controle de pragas nas culturas, tanto por exposição tópica quanto por ingestão de recursos contaminados com resíduos de agrotóxicos (IMPERATRIZ-FONSECA, 2004; MALASPINA; SILVA-ZACARIN, 2006; GOULSON *et al.*, 2015; KLEIN *et al.*, 2017).

De acordo com o relatório anual de comercialização de agrotóxicos no Brasil, em 2020 foram comercializadas 685.745,68 toneladas de ingredientes ativos no país. O Sudeste foi a terceira região que mais comercializou agrotóxicos: do total de 143.665,39 toneladas, cerca de 88.954,49 foram comercializadas pelo Estado de São Paulo, o qual lidera o ranking de comercialização de substâncias na região Sudeste, ultrapassando Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (IBAMA, 2020).

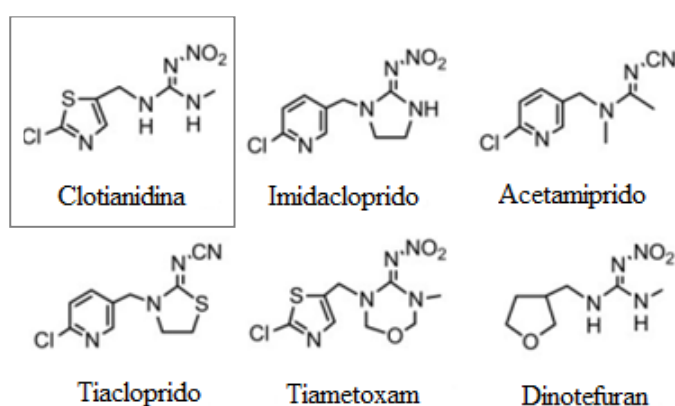
Dentre os diferentes grupos de substâncias comercializadas, estão os neonicotinoides, inseticidas de ação neurotóxica para insetos. Esses compostos atuam como agonistas da acetilcolina ligando-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) nos insetos, localizados nos neurônios pós-sinápticos, causando hiperexcitação do sistema nervoso e levando o indivíduo a morte (BUCKINGHAM *et al.*, 1997; SUCHAIL *et al.*, 2004).

Os neonicotinoides possuem característica sistêmica e podem ser translocados por meio dos vasos condutores de seiva. Dessa forma, a substância pode ser encontrada em todas as partes da planta, incluindo o pólen e néctar das flores, que é uma via de exposição às abelhas. Em consequência desse fator, as operárias forrageiras podem coletar recursos contaminados com inúmeras dessas substâncias e, ao levarem até a colônia, todos os indivíduos são afetados, incluindo as larvas (JAY, 1986; BLACQUIÈRE *et al.*, 2012).

No Brasil destaca-se a utilização de seis tipos de neonicotinoides: acetamiprido, clotianidina, dinotefuram, imidacloprido, tiacloprido e tiametoxam

(Figura 1). Sabe-se que a clotianidina é o metabólito do tiametoxam, e possui classificação ambiental III (Produto perigoso ao meio ambiente). Atualmente, dois produtos formulados para tratamento de sementes contém o ingrediente ativo clotianidina e são comercializados para controlar insetos praga nas culturas de soja, milho e algodão. (NAUEN, *et al.*, 2003; RANCAN; ROSSI; SABATINI, 2006; BRASIL-MAPA, 2022).

Figura 1. Representação das estruturas químicas dos principais neonicotinoides utilizados no Brasil, com ênfase na clotianidina.



Fonte: Adaptado de UCHIGASHIMA *et al.* (2012)

As abelhas podem ser expostas a produtos formulados a base desses inseticidas por meio de dois cenários de exposição: na área tratada (*in crop*), e em áreas adjacentes (*off crop* = fora da área tratada). A aplicação do produto ocorre diretamente na área tratada, mas as áreas adjacentes, que não fazem parte dos cultivos agrícolas, podem ser atingidas pela aplicação do produto na área tratada (IBAMA, 2017). Em vista disso, espécies de abelhas silvestres de gênero não-*Apis*, como a *S.postica*, podem ser expostas tanto nas áreas *in crop* quanto *off crop*

Diversos estudos na literatura demonstraram a presença de neonicotinoides em recursos florais, como pólen e néctar das flores de culturas agrícolas, tratados especialmente com produtos comerciais formulados a base desses inseticidas, incluindo a clotianidina. (BYRNE *et al.*, 2014; DIVELY; KAMEL, 2012; POHORECKA *et al.*, 2012; SCHMUCK *et al.*, 2001; STONER; EITZER, 2012). Mas pouco se sabe sobre como esses produtos podem afetar a saúde de abelhas sem ferrão, uma vez que a maior parte dos dados disponíveis na literatura foram produzidos para abelhas de gênero *Apis*.

Kasiotis *et al.* (2014), encontraram uma grande quantidade de clotianidina em pólen coletado por abelhas *A. mellifera*. No referido trabalho, cerca de 50% das amostras analisadas continham esse composto. Tadei *et al.* (2019) também observaram que os impactos da clotianidina em larvas e adultos de abelhas *A. mellifera* são muito severos, diminuindo drasticamente a longevidade das abelhas. Além disso, as larvas expostas à clotianidina, via alimentação, apresentaram efeitos após a emergência, como a redução dos padrões de sobrevivência das abelhas, o que pode prejudicar e comprometer a dinâmica da colônia.

Na maioria dos casos, os efeitos causados por baixas concentrações de agrotóxicos não levam à morte imediata, mas têm o potencial para afetar o comportamento e a fisiologia a longo prazo. Em concentrações subletais, os neonicotinoides podem afetar a memória, gerar problemas crônicos e aumentar os efeitos de patógenos em larvas e adultos de abelhas, comprometendo a capacidade do indivíduo de combater as patologias (FRAZIER *et al.*, 2008; WHITEHORN *et al.*, 2012). Apesar do órgão alvo ser o sistema nervoso, quando estes compostos são ingeridos, entram em contato primeiramente com os órgãos do sistema digestório e excretor (intestino e túbulos de Malpighi), os quais atuam para barrar os processos de intoxicação (LAVINE; STRAND, 2002; CRUZ-LANDIM, 2009; ROSSI, 2011; CATAE *et al.*, 2014).

O trato digestório dos insetos é um tubo alimentar dividido em três partes: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (SNODGRASS, 1956). Possui formato de arco na cavidade abdominal, e apresenta células digestivas que possuem um importante papel na produção de enzimas. Essas células são as mais afetadas por substâncias tóxicas e patogênicas, especialmente por possuírem maior contato com o alimento que é ingerido (CRUZ-LANDIM, 1999; CAESTANO *et al.*, 1994; SERRÃO, 1995).

Os túbulos de Malpighi são extensões finas conectadas ao trato intestinal, mais especificamente entre o intestino médio e o intestino posterior. Após a digestão do alimento pelo intestino, as substâncias absorvidas passam para a hemolinfa e, então, podem chegar aos túbulos de Malpighi para a excreção. Os túbulos possuem um papel fundamental durante os processos de desintoxicação, especialmente por agirem na excreção de substâncias não metabolizadas ou em excesso no organismo das abelhas. (NOCELLI, *et al.*, 2016). Ao receber as moléculas dos agrotóxicos, ingeridas pelas abelhas, os órgãos podem apresentar alterações morfológicas e

bioquímicas induzidas por esses contaminantes ambientais (THIBOLDEAUX *et al.* 1998; SOROUR 2001; NOCELLI *et al.*, 2012).

Uma das maneiras de investigar os efeitos da clotianidina nos órgãos, é por meio de análises morfológicas e bioquímicas. As análises de alterações morfológicas são importantes pois indicam se as células do trato digestório das abelhas estão sofrendo danos em decorrência da exposição ao inseticida (SILVA-ZACARIN *et al.*, 2010). Diversos trabalhos observaram alterações morfológicas em órgãos de abelhas expostas a agrotóxicos via exposição oral (SOARES, 2012; LAURINO *et al.*, 2011; CATAE *et al.*, 2014; CARNEIRO, 2018).

A presença de inseticidas nos órgãos das abelhas altera os processos naturais das células, ativando os mecanismos de desintoxicação e recuperação dos órgãos. Em último caso, quando os danos são irreversíveis, pode ocorrer a morte celular, comprometendo a recuperação e o funcionamento do órgão (NOCELLI *et al.*, 2012). Diante desse contexto, uma análise profunda em nível bioquímico é de extrema importância, a fim de investigar o padrão das alterações na atividade de enzimas biomarcadoras, tanto do sistema de desintoxicação quanto as enzimas de estresse oxidativo, visto que o aumento ou a inibição na atividade dessas enzimas pode indicar uma resposta ao estressor ambiental (COGO *et al.*, 2009).

Os biomarcadores são alterações biológicas ao nível molecular, celular ou fisiológico, capazes de indicar a exposição do organismo e o grau de estresse causado pelo contaminante ambiental (WALKER, 1996; CAJARAVILLE *et al.*, 2000). As enzimas carboxilesterase 3 (CaEs-3) e glutationa-S-transferase (GST) são biomarcadores de exposição a xenobióticos, atuam ativamente no processo de desintoxicação de compostos químicos. As CaEs estão presentes nas primeiras vias de desintoxicação, e as enzimas GST participam da segunda via, sendo uma das mais importantes enzimas de biotransformação (BELZUNCES *et al.*, 1988; DELAGE-DARCHEN *et al.*, 1982; RUVOLO-TAKASUSUKI *et al.*, 1997).

Em estudos de Tavares (2015), a atividade de enzimas de exposição (GST e CaEs) aumentou significativamente durante a fase larval e pupal de abelhas *A. mellifera*, devido a exposição ao neonicotinoide tiametoxam. A atividade enzimática variou de acordo com os estágios de desenvolvimento das abelhas. Outros estudos também demonstraram que a resposta enzimática em decorrência a exposição a xenobióticos pode variar (BADIOU-BÉNÉTEAU *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013). Por outro lado, nos processos oxidativos estão envolvidas as enzimas

responsáveis pelas defesas antioxidantes. Essas enzimas são responsáveis por agir por meio de mecanismos de prevenção, impedindo o desequilíbrio na produção de radicais livres (espécies reativas de oxigênio – EROs) (COGO *et al.*, 2009; BARBOSA *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo é ocasionado pelo desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, culminando em um descontrole na formação de EROs. Para manter a integridade das células, a prevenção de danos oxidativos ao DNA é realizada pelas enzimas antioxidantes, que regulam e atuam ativamente para manter o equilíbrio entre as moléculas. O estudo da atividade dessas enzimas tem eficiência para indicar uma resposta celular do organismo, em decorrência do processo de estresse oxidativo. Uma vez que esse processo gera a oxidação de moléculas e a perda de suas funções biológicas, implicando em danos oxidativos às células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004; WOUNG *et al.*, 2000; BARBOSA *et al.*, 2010)

Nesse contexto, o sistema antioxidante é constituído por enzimas como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutathiona peroxidase (GPx). É mediante esse sistema que o organismo é capaz de manter as concentrações corretas de EROs dentro dos limites fisiológicos (DANDEKAR *et al.*, 2002; BARBOSA *et al.*, 2010; STANTON, 2012).

Balieira (2017), observou em seus estudos que o inseticida imidacloprido aumentou a atividade de enzimas antioxidantes GPx no tórax de abelhas *A. mellifera*, indicando uma ação pró-oxidante. Contudo, a maioria dos estudos são com a espécie exótica *A. mellifera*, e nada se sabe sobre a atividade de enzimas biomarcadoras em abelhas *S. postica*, expostas a clotianidina no período larval.

A *S. postica* é a espécie nativa mais adequada para ser atribuída como organismo modelo e representante das abelhas nativas em testes de toxicidade durante a fase larval (ROSA-FONTANA *et al.*, 2020). Ademais, em virtude do atual questionamento sobre o uso da *A. mellifera* como organismo modelo e substituto de espécies nativas brasileiras, é de suma importância a produção de dados sobre abelhas sem ferrão, uma vez que são várias as espécies nativas que têm se mostrado mais sensíveis a substâncias do que a abelha de gênero *Apis* (PIRES *et al.*, 2016; IBAMA, 2017).

Em vista disso, estudos de efeitos subletais de abelhas expostas a esse composto via alimentação larval, são de extrema importância para entender se, e

como, esse inseticida interfere no desenvolvimento e na sobrevivência de abelhas nativas sem ferrão. Dentre os estudos, análises de alterações morfológicas e da atividade de enzimas biomarcadoras em órgãos relacionados à absorção e metabolização de substâncias (intestino e túbulos de Malpighi), tem sido amplamente empregados (SOARES *et al.*, 2015; JACOB *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Considerando a importância ecológica, econômica e a ausência de dados para os efeitos da clotianidina durante as fases de desenvolvimento de larvas, pupas e após a emergência de abelhas *S. postica*, o presente estudo é inédito por ser o primeiro a avaliar os efeitos da exposição larval a clotianidina e trazer informações essenciais no que se refere aos impactos desse inseticida sobre essa espécie de abelha sem ferrão.

2.OBJETIVO GERAL E ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Com base na atual necessidade de conhecimento sobre os impactos do agrotóxico clotianidina em insetos polinizadores; tendo em vista a escassez de dados e a existência de lacunas de conhecimento acerca dos efeitos desse neonicotinoide em abelhas nativas sem ferrão, especialmente *Scaptotrigona postica*. O presente estudo teve como principal propósito e objetivo: fornecer subsídios para melhor elucidar a toxicidade da clotianidina em abelhas *S. postica*, em outros estágios de desenvolvimento além do indivíduo adulto.

Para tanto, a dissertação será apresentada em dois capítulos. O primeiro apresenta os resultados dos parâmetros biológicos, como taxas de mortalidade, pupação, defecação, emergência e o tempo de desenvolvimento em cada fase, obtidos nos bioensaios de criação larval com exposição a clotianidina. O segundo capítulo apresenta os resultados obtidos sobre a toxicidade da clotianidina na morfologia de tecidos de órgãos de metabolização de substâncias (intestino médio e túbulos de Malpighi) de recém emergidas. Como também os resultados da modulação da atividade de enzimas antioxidantes e de desintoxicação, nos órgãos supracitados de abelhas recém emergidas.

3.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIOLI, C. J., *et al.* Polinizadores em perigo: por que nossas abelhas estão desaparecendo? In: Embrapa Uva e Vinho-Artigo em anais de congresso. In: Simpósio Internacional Ciência, Saúde e Território, 4., 2017, Lages, SC. Anais Alimentos seguros, nutritivos e suficientes. Lages, SC: UNIPLAC, 2017.

BLACQUIÈRE, T., *et al.* Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. Ecotoxicology, 21(4), p. 973-992, 2012.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A., *et al.* Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide Thiamethoxam. Ecotoxicol. Environ. Saf., New York, v. 82, p. 22–31, 2012.

BARBOSA K.B.F, COSTA N.M.B, ALFENAS R de C.G, *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. Rev. Nutr., Campinas, 23(4):629-643, doi: 10.1159/000320546, jul./ago., 2010.

BALIEIRA, K.V.B. Efeito oxidante do imidacloprido em abelhas melíferas (*Apis mellifera* L.) e potencial ação antioxidante da cafeína. (Dissertação), Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” faculdade De Ciências Agrárias E Tecnológicas - CAMPUS DE DRACENA, 2017.

BELZUNCES, L. P.; TOUTANT, J. P.; BOUNIAS, M. Acetylcholinesterase from *Apis mellifera* head. = Evidence formphiphilic and hydrophilic forms characterized bytriton X-114 phase separation. Biochem. J., [S. I.], v. 255, p. 463-470, 1988.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. Anal. Biochem., New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BPBES/REBIPP: Relatório temático sobre Polinização, Polinizadores e Produção de Alimentos no Brasil. WOLOWSKI, M. *et al.* (Org.). 1ª edição, Campinas, SP. 184 páginas, 2019.

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

BUCKINGHAM, S.D., LAPIED, B., LE CORRONC, H., GROLLEAU, F., SATTELLE, D.B. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. J. Exp. Biol. 200(21), 2685- 2692, 1997.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D.; Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region, 2013.

CAJARAVILLE, M. P., *et al.* The useof biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. Sci. Total Environ., Bethesda, v. 247, p. 295-311, 2000.

CARNEIRO, L. S. Efeito citotóxico do iprodione no intestino médio de operárias da abelha *Apis mellifera*. (Dissertação mestrado), 2018.

CARVALHO, S. M., *et al.* Enzymatic biomarkers as tools to assess environmental quality: a case study of exposure of the honey bee *Apis mellifera* to insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.*, New York, v. 32, n. 9, p. 2117–2124, 2013.

CAESTANO, F.H.; JAFFÉ, K.; CREWE, R.W. The digestive tract of the *Catantopus* ants: presence of the microorganisms in the ileum. 12th Congress of the International Union for the Study of Social Insects. p.391, 1994.

CRUZ-LANDIM, C. Abelhas - Morfologia e Função de Sistemas. 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, p. 407, 2009.

CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. *Sociobiology*, Chico, v. 34, n. 3, p. 597-603, jan. 1999.

CEPEA - CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. Relatório PibAgro - Brasil, 2014.

CATAE, A. F., *et al.* Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.*, 77: 274-281, 2014.

COGO, A. J. D., *et al.* Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza online*, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

DAILY, G. C. *Nature's Services: Societal Dependence on Natural Ecosystems*. Washington: Island Press, 1997.

DELAGE-DARCHEN, B.; RAMOS DE CONCONI, J.; AGUILAR, C. Comparaison entre l'équipement enzymatique des glandes salivaires et l'intestin moyen de diverses espèces d'abeilles sociales. *Apidologie*, v.13, p.265-273, 1982.

DANDEKAR, S. P.; NADKARNI, G.D.; KULKARNI, V.S.; PUNEKAR, S. Lipid Peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *Journal of Postgraduate Medicine*, v.48, n.3, p.186-190, 2002.

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

FRAZIER, M.; MULLIN, C.; FRAZIER, J.; ASHCRAFT, S. What have pesticides got to do with it? *American Bee Journal*, v.148, p. 521-523, 2008.

GOMORI, G. Human esterases. *J. Lab.Clin. Med.*, Saint Louis, v. 42, p. 445-453, 1953.

GOULSON, D. *et al.* Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science, Washington, v. 347, n. 6229, p. 1-16, 2015.

GIANNINI, T.C. *et al.* The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. Journal of Economic Entomology, p.1–9. 2015.

HALLIWELL, B; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cellculture: How should you do it and what do the results mean? Br J Pharmacol 142:231–255. doi: 10.1038/sj.bjp.0705776, 2004.

HABIG, W. H., *et al.* The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. Proceedings of the National Academy of Sciences, 71(10), 3879-3882, 1974.

HEITHAUS, E.R. The role of plant-pollinator interactions in determining community structure. Annual Missouri Botanical Garden, p. 61:675-691, 1974.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Acessado em maio de 2022. Disponível em <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#>>, 2020.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Manual de Avaliação de Risco Ambiental de Agrotóxicos para Abelhas. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/reavaliacaoambiental/2017/2017-07-25-Manual-IBAMA-ARA-Abelhas-IN0217-WEB.pdf>, 2017.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Serviços aos ecossistemas, com ênfase nos polinizadores e polinização. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/vinces/logo/servicosaosecosistemas_polinizadores_vera.pdf>, p. 10, 2004.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; JOLY, C. A. Avaliação Polinizadores, Polinização e Produção de Alimentos da Plataforma Intergovernamental de Biodiversidade e Serviços de Ecossistemas (IPBES). Centro de Gestão e Estudos Estratégicos (CGEE). In: Importância dos polinizadores na produção de alimentos e na segurança alimentar global. Brasília, DF: 124p. 2017.

IPBES. The assessment report on Pollinators, Pollination and Food production. Summary for policymakers. Co –Chairs: Simon Potts (UK), Vera L. Imperatriz-Fonseca (Brasil). MCTI/USP, 2017.

JACOB, C. R. O. *et al.* Impact Of Fipronil On The Mushroom Bodies Of The Stingless Bee *Scaptotrigona Postica*. Pest Management Science (Print) , 2014.

JAY, S.C. Spatial management of honeybees on crops. Annual Reviews of Entomology, 31: 49-65, 1986.

JACOB, C. R. O. *et al.* Acute Toxicity of Fipronil to the Stingless Bee *Scaptotrigona postica* Latreille. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 90, p. 69-72, 2013.

JUNIOR MOTTA, J.C. A dieta equilibrada do lobo Guará. Pesquisa Fapesp. 52 eds. abril. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2000/04/01/a-dieta-equilibrada-do-lobo-guara/>>, 2000.

KASIOTIS, K. M.; ANAGNOSTOPOULOS C.; ANASTASIADOU, P.; MACHERA, K. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC–MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. Science of the Total Environment 485–486/633–642, 2014.

KLEIN, A. M. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences, v. 274, p. 303-313, 2007.

KLEIN, S., CABIROL, A., DEVAUD, J. M., BARRON, A. B., & LIHOREAU, M. Why Bees Are So Vulnerable to Environmental Stressors. Trends in Ecology and Evolution. Elsevier Ltd, 2017.

KEVAN, P.; VIANA, B.F. The global decline of pollination services. Biodiversity, p. 4:3-8, 2003.

KERR, W.E. *et al.* Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. -- Belo Horizonte, MG: Acanga, p. 157, 1996.

KREMEN, C. Pollination services and community composition: does it depend on diversity, abundance, biomass or species traits? Pp. 115-124. In: B.M. Freitas & J.O.B. Portela (eds.). Solitary bees: conservation, rearing and management for pollination. Imprensa Universitria – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. 285p, 2004.

LAURINO, D.; PORPORATO, M.; PATETTA, A.; MANINO, A. Toxicity of Neonicotinoid Insecticides to Honey Bees: Laboratory Tests. Bulletin of Insectology, Bologna, v.64, n.8, p.107-113, 2011.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

MALASPINA, O.; SILVA-ZACARIN, E. C. M. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. Brazilian Journal of Morphological Sciences, São Paulo, v. 23, n. 1-3, p. 303-309, 2006.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay of superoxide dismutase. Eur. J. Biochem, Berlin, v. 47, p. 469-474, 1974.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. Ecosystem and Human Well-Being: a framework for assessment. Island Press, Washington, DC, 2003.

MILLENNIUM ECOSYSTEM ASSESSMENT. Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis. Island Press, Washington, DC, 2005.

MICHALSKI, L.J.; BARBOLA, I. de.F; LUZ, P.M. da. Ecologia trófica do lobo-guará, *Chrysocyon Brachyurus* (ILLIGER, 1811), no Parque Estadual do Guartelá, Tibagi, PR, Brasil. *Revista Brasileira de Zoociências* 15 (1, 2, 3): 107-122. 2013.

MICHENER, C.D. Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees, New York: Springer. p.654, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). AGROFIT. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. 2022.

NAUEN, R. Thiametoxam is neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, San Diego, v.76, n2, p.55-69, 2003.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 446p, 1997.

NOCELLI, R.C.; ROAT, T.C.; ZACARIN, E.C.S.; MALASPINA, O. Riscos de pesticidas sobre as abelhas. In: Semana dos Polinizadores, 3., 2012, Petrolina. Palestras e resumos... Petrolina: Embrapa Semiárido. (Embrapa Semiárido. Documentos, 249), 2012.

NOCELLI, R.C. *et al.* Comparative physiology of Malpighian tubules: form and function. *Open Access Insect Physiology*. April 2016.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals, section 2, effects on biotic systems. Honeybees, Acute Oral Toxicity Test, n.213, set. 1998.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, Saint Louis, v. 70, p. 158-169, 1967.

PEDRO, S.R.M. The Stingless Bee Fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 61(4): p.348-354, 2014. 2014.

PERROT, T., *et al.* Experimental quantification of insect pollination on sunflower yield, reconciling plant and field scale estimates. *Basic and Applied Ecology*, 34, 75–84., 2019.

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

RANCAN, M.; ROSSI, S.; SABATINI, A. G. Determination of Thiamethoxam residues in honeybee by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v.1123, p.60-65, 2006.

ROSSI, C. A. Efeitos de doses subletais do imidaclopride no cérebro, ventrículo e túbulo de malpighi de *Apis mellifera* africanizada. (dissertação). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, câmpus de Rio Claro. 2011.

ROSA-FONTANA, A. S., *et al.* What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. Environmental pollution, v. 265, p. 114849, 2020.

ROUBIK, D. W. The pollination of cultivated plants: a compendium for practitioners. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO), Roma, 2018.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; DEL LAMA, M.A.; SOARES, A.E.E. Genetic characterization of a new *Apis mellifera* esterase. Apidologie, v.28, p.259-267, 1997.

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

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Gut Structures In Adult Workers Of Necrophorous Neotropical Stingless Bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Entomologia Generalis, v. 19, n. 4, p. 261-265, 1995.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. *et al.* Structure and function of the intestine and Malpighian tubules: from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. Chapter in Social Insects: Structure, Function and Behavior. Nova Science Publishers, USA, p. 27, 2010.

SILVA, C.I. *et al.* Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras do Brasil. 1ª Edição. Usp, São Paulo – SP. 2014.

SOARES, H. M. Avaliação dos efeitos do inseticida imidacloprido para abelhas sem ferrão *Scaptotrigona postica* LATREILLE, 1807 (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINI). (Dissertação), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, câmpus de Rio Claro. 2012.

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, p. 675-680, 2015.

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

SOROUR J. Ultrastructural variations in *Lethocerus niloticum* (Insecta:Hemiptera) caused by pollution in Lake Mariut, Alexandria, Egypt. Ecotoxicol. Environ. Saf. 48:268–74, 2001.

STANTON, R.C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. IUBMB Life, 64(5): 362–369, 2012.

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

SUCHAIL, S., DEBRAUWER, L., BELZUNCES, L.P. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. Pest. Manag. Sci. 60(3), 291-296. doi: 10.1002/ps.772, 2004.

THIBOLDEAUX R.L., LINDROTH R.L., TRACY J.W. Effects of juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) on midgut morphology and glutathione status in Saturniid moth larvae. Comp Biochem Physiol Part C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 120(3):481–7, 1998.

TAVARES, D.A. Avaliação bioquímica e imunohistoquímica dos efeitos subletais do tiametoxam sobre *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). (Tese) Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – campus de Rio Claro, 2015.

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. Sci Rep. doi: 10.1038/s41598-019-39383-z. 1 Mar, 2019.

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

WALKER, C. H.; SIBLY, R. M.; HOPKIN, S. P.; PEAKALL, D. B. Principles of Ecotoxicology. London: Taylor & Francis, 321 p., 1996.

WHITEHORN, P.R.; O’CONNOR, S.; WACKERS, F.L.; GOULSON, D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. Science, v.336, p.351-352, DOI: 10.1126/science.1215025., 2012.

WOUNG, W. Y.; THOMAS, C.M.; MERKUS, J.M.; ZIELHUIS, G.A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. Fertility and Sterility, v.73, n.3, p.435-442, 2000.

WRATTEN, S.D. *et al.* Pollinator habitat enhancement: Benefits to other ecosystem services. Agriculture, Ecosystems and Environment. v 159, p. 112-122, 2012.

4.CAPÍTULO 1

Concentrações ambientalmente relevantes do agrotóxico clotianidina afetam a sobrevivência e o desenvolvimento de abelhas *Scaptotrigona postica*?

Isabella F. Camargo^{1*}, Annelise S. Rosa-Fontana¹, Rafaela Tadei¹, Roberta C. F. Nocelli².

¹Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-SP), Rio Claro, SP, Brasil.

²Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-SP), Araras, SP, Brasil.

4.1. INTRODUÇÃO

As abelhas são os polinizadores primários para a maioria das culturas que carecem de polinização animal (DELAPLANE; MAYER, 2000; FREE, 1993; KLEIN *et al.*, 2007). O valor desse serviço ecossistêmico realizado por esses insetos é considerado incalculável, por sua vez, mesmo as culturas não dependentes de polinização apresentam melhoras na produção e na qualidade dos frutos e grãos, como a soja. Além disso, existem culturas que não produzem frutos na ausência de polinizadores, como é o caso do maracujá (MILFONT *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2017; IMPERATRIZ-FONSECA; JOLY, 2017).

A polinização realizada por abelhas sem ferrão é essencial para a reprodução das plantas nativas brasileiras e de diferentes culturas agrícolas (MACIEIRA; PRONI, 2004; KERR *et al.*, 2010). No entanto, ao forragearem ambientes cultivados, esses insetos são suscetíveis a exposição por agrotóxicos. Dentre eles, os inseticidas neonicotinoides, que estão entre os mais frequentemente encontrados nos recursos florais coletados pelas abelhas, como o pólen e néctar (RAIMETS *et al.*, 2019).

Os neonicotinoides evoluíram da primeira geração – imidacloprido – para a segunda geração – tiametoxam e seu metabólito clotianidina –, em virtude da necessidade de desenvolver e encontrar novas moléculas para combater pragas nas culturas. A clotianidina é a molécula mais recentemente incluída ao grupo de

inseticidas classificados como neonicotinoides, especialmente devido ao seu potencial neurotóxico. (RANCAN; ROSSI; SABATINI, 2006; UNEME *et al.*, 2006; UNEME, 2011).

Em razão da persistência desses componentes sistêmicos no meio ambiente, seus resíduos podem ser translocados por meio da seiva das plantas, estando presentes no recursos florais coletados para produzir alimento para nutrir abelhas adultas e larvas. Nesse contexto, em função da estrutura social das abelhas, todos os indivíduos podem ser contaminados a nível de colônia, incluindo as crias (SIMON-DELSO *et al.*, 2014; BEYER *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2014).

Em alguns estudos na literatura, a exposição crônica à clotianidina prejudicou a resposta imune de abelhas (PRISCO *et al.*, 2013), reduziu o comportamento higiênico, a sobrevivência de larvas e alterou o comportamento da rainha com relação a postura de ovos (TSVETKOV *et al.*, 2017). Em vista disso, devido à preocupação com o declínio das populações de abelhas silvestres e o número de colônias, em 2013 o uso da clotianidina e de mais outros dois neonicotinoides foi proibido pela Comissão Europeia (BLACQUIÈRE; VAN DER STEEN, 2017; EFSA, 2013a, b, c; EFSA, 2014).

No entanto, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos já banidos por outros países (CARNEIRO *et al.*, 2015). Em locais onde o uso da clotianidina é permitido, o produto é aplicado para o tratamento de sementes e, portanto, é facilmente absorvido do solo, transportado para todos os tecidos vegetais por meio dos vasos condutores de seiva e, finalmente, incorporado ao pólen e néctar. Podendo se espalhar também para áreas ao redor do campo tratado e, assim, atingir plantas não-alvo e flores silvestres visitadas por abelhas (BONMATIN *et al.*, 2015; BOTÍAS *et al.*, 2015).

Diante deste cenário, a exposição de abelhas por esses compostos tem sido uma preocupação crescente. Os órgãos responsáveis por realizar as avaliações de risco ambiental de agrotóxicos no Brasil, representados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), tem empregado esforços para implementar um esquema de avaliação de risco para polinizadores, com o intuito de torná-lo obrigatório para o registro desses produtos no país. (IBAMA, 2017).

No entanto, um dos maiores obstáculos é a ausência de dados para espécies nativas de abelhas sem ferrão (IBAMA, 2017). O Brasil é o país com maior

biodiversidade de abelhas sem ferrão (Apidae: Meliponini) do mundo (MICHENER, 2013). E apesar dessa riqueza de espécies, a abelha *Apis mellifera* L. é utilizada como organismo-modelo e representante das espécies nativas brasileiras em estudos ecotoxicológicos. A razão para esta escolha deve-se, principalmente, a sua ampla distribuição geográfica, facilidade no manejo e manutenção de colônias, ter a biologia bem conhecida, ser abundante e ter valor agregado em produtos como mel, própolis e etc (KEVAN *et al.*, 2007; KLEIN *et al.*, 2007).

Contudo, questiona-se a segurança do uso de uma espécie exótica como melhor organismo indicador para representar as espécies nativas do Brasil em avaliações desta magnitude (IBAMA, 2017). Com base nesse questionamento, Rosa-fontana e colaboradores (2020) compararam métodos de criação larval entre três espécies de abelhas sem ferrão, e observaram que a espécie *Scaptotrigona postica* é a mais adequada para uso em testes ecotoxicológicos na fase larval.

A maioria dos dados existentes sobre a toxicidade de agrotóxicos em abelhas foram produzidos para a espécie *A. mellifera*. São escassos os estudos com foco nos efeitos de agroquímicos em abelhas sem ferrão (LIMA *et al.*, 2016), como a *S. postica*. Além disso, existe a preocupação de se estender estudos de toxicidade sobre a clotianidina para larvas e adultos de espécies nativas, uma vez que este composto foi reavaliado pelo IBAMA considerando a espécie *A. mellifera* como organismo indicador. Conforme o parecer técnico sobre a reavaliação ambiental da clotianidina, há incertezas na avaliação empregada, sendo necessárias maiores investigações no que se refere a toxicidade da clotianidina em larvas e adultos de abelhas nativas sem ferrão (IBAMA, 2021).

Diante dessa demanda, o presente estudo contribui para melhor elucidar a toxicidade da clotianidina em larvas e adultos de abelhas *S. postica*; fornece dados relevantes a serem incluídos nas investigações do IBAMA e nos processos regulatórios de registro de novos agrotóxicos e; contribui para o desenvolvimento de medidas protetivas para a conservação dessa espécie de abelha sem ferrão.

4.2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo responder uma importante questão: Os efeitos de concentrações residuais e ambientalmente relevantes de clotianidina

oferecidas no alimento larval, interferem na sobrevivência e no desenvolvimento de larvas e adultos de abelhas *S. postica*?

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base na questão proposta, os objetivos específicos foram:

- I) Avaliar os impactos da clotianidina nas taxas de sobrevivência, pupação e emergência de abelhas *S. postica* nos bioensaios de criação *in vitro*.
- II) Avaliar o tempo de desenvolvimento em 5ª instar larval, defecação e a mudança na coloração de olhos das pupas, a fim de verificar se as concentrações realísticas de campo de clotianidina interferem negativamente na progressão das fases de desenvolvimento, desde o primeiro instar larval até a emergência dos adultos de *S. postica*.

4.4. MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1. Coleta do material biológico para bioensaios *in vitro*

Favos de cria da espécie *S. postica* foram coletados de colônias não parentais no meliponário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro (22°23' 48.851" S; 47° 32'38.234" W). Para as coletas foram selecionadas três colônias fortes, com grande número de indivíduos e rainha jovem. A coleta foi realizada respeitando intervalos de 40 dias para a recuperação e desenvolvimento de novas operárias, de modo que não prejudicasse a saúde e dinâmica das colônias. Dessa forma, foram coletados favos contendo ovos para a retirada do alimento larval e favos contendo larvas de primeiro instar (recém-eclodidas) para os bioensaios de criação *in vitro*.

4.4.2. Obtenção das concentrações ambientalmente relevantes de clotianidina

O ingrediente ativo utilizado foi a clotianidina PESTANAL® (C₆H₈ClN₅O₂S), padrão analítico Sigma-Aldrich, pureza ≥98,0%. Para os bioensaios de exposição foram utilizadas concentrações realísticas de campo, considerando o pior cenário de aplicação. Para tanto, foram observadas as características recomendadas pelo produto comercial, para quais culturas o produto é indicado, quais as concentrações utilizadas e qual o modo de aplicação.

O inseticida clotianidina é utilizado para o tratamento de sementes, em vista disso, foi realizado o cálculo da dose por hectare ($D_h = \text{g/ha}$) para kg i.a./ha , unidade de medida necessária para determinar a concentração ambiental estimada (CAE) do agrotóxico, à qual as abelhas podem ser expostas no pólen e néctar das flores, conforme o modelo BeeRex (Bee = abelha; REX = exposição de resíduos) utilizado pelo IBAMA e desenvolvido pela US-EPA (United States Environmental Protection Agency) (IBAMA, 2017).

Nesse contexto, para a caracterização da exposição, foi utilizada a planilha BeeRex que estima o valor de resíduos capazes de alcançar os recursos florais a partir da dose comercial, considerando a aplicação para tratamento de sementes. Com base nos cálculos para obtenção da CAE de clotianidina, foram utilizadas duas concentrações na ordem de ng/microlitro , uma concentração de campo e uma concentração de campo/10 (representando uma concentração subletal), sendo $1 \text{ ng i.a./}\mu\text{L}$ e $0,1 \text{ ng i.a./}\mu\text{L}$, respectivamente. Ambas as concentrações residuais também foram encontradas em condições realísticas de campo em diversos estudos na literatura. (HERNANDO *et al.*, 2018; SCHNEIDER *et al.*, 2012; ALKASSAB; KIRCHNER, 2018).

4.4.3. Bioensaios de exposição a clotianidina

Com base nas concentrações obtidas, foi realizado o preparo de uma solução estoque contendo 10 mg de clotianidina para 10 mL de alimento larval (1/1), relação de massa e volume (m/v). A clotianidina não é solúvel em água, em vista disso, a diluição foi realizada em 5% de acetona ($0,5 \text{ mL}$), posteriormente essa solução foi diluída diretamente no alimento larval coletado dos favos ($9,5 \text{ mL}$). A partir dessa solução estoque, foram realizadas sucessivas diluições em cascata até a obtenção das dietas finais para a concentração de campo e a concentração subletal a serem oferecidas as larvas.

Os bioensaios contaram com o grupo controle que recebeu apenas o alimento puro, controle solvente (alimento + 5% acetona) e os grupos expostos, contendo as concentrações do inseticida. Para o grupo controle solvente também foi realizada uma cascata de diluição, uma vez que a porcentagem de acetona obtida nas concentrações a serem utilizadas nos grupos não é exatamente 5%, mas sim uma concentração menor devido as sucessivas diluições. Em vista disso, a partir da solução estoque de alimento + 5% de acetona, foram realizadas as diluições a fim

de alcançar as mesmas concentrações obtidas nos grupos expostos, de modo que não alterasse a consistência e as propriedades do alimento larval.

Os bioensaios *in vitro* foram realizados com base nos métodos descritos por Rosa-Fontana *et al.* (2020) para abelhas nativas *S. postica*. Foram preparadas placas de acrílico com 100 cavidades, com altura e dimensão idênticas aos favos naturais de *S. postica*, a fim de reproduzir o desenvolvimento natural das abelhas que ocorre no campo. Os grupos experimentais foram realizados em triplicata, contabilizando 30 larvas por réplica (3x30), totalizando 90 larvas por placa para cada grupo experimental. Em vista disso, 360 larvas foram necessárias para realizar as transferências dos 4 grupos experimentais.

Durante os bioensaios de retirada de alimento e transferência de larvas, a sala foi mantida úmida para garantir a integridade dos favos, com o auxílio de dois ebulidores de água quente e um umidificador de ar, para impedir a desidratação e o ressecamento do alimento e das larvas. O alimento foi coletado diretamente das células de cria dos favos de cada colônia e homogeneizado para ser distribuído nos poços das placas com uma micropipeta automática de repetição, durante os bioensaios de exposição. Cada poço recebeu o total de 25 µL de alimento, valor equivalente ao consumo de alimento da espécie *S. postica* durante a fase larval, estabelecido por Dorigo *et al.* (2018).

Após a distribuição de todo o alimento larval nos poços das placas, as larvas de primeiro instar foram transferidas com o auxílio de uma agulha apícola, uma vez que a alimentação de larvas em abelhas sem ferrão ocorre de forma massiva, sendo necessário depositar o alimento de uma única vez nas células de cria antes da oviposição (VELTHUIS, 1998).

Após a transferência das larvas, as placas de acrílico foram acondicionadas em placas de Petri de vidro, contendo água destilada no fundo. A água destilada foi utilizada para manter a umidade entre 95±5% nos primeiros dias de incubação. Essas placas foram acondicionadas em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) com ausência de luz, a 28°C (Figura 2).

Após 72h da transferência, a umidade interna das placas foi reduzida para 75% com uma solução de cloreto de potássio (KCl), que foi introduzida nas placas de Petri junto a água destilada. Após esse período foi realizada a substituição do KCl por cloreto de sódio (NaCl) em 120h do período de incubação. Essas condições

foram controladas com termo-higrômetro e mantidas até o final dos experimentos (ROSA-FONTANA *et al.*, 2020).

Os parâmetros biológicos foram observados e registrados a partir de 24 horas após a transferência das larvas até a emergência das abelhas, de acordo com o progresso do bioensaio. São indicativos da progressão das fases de desenvolvimento: 5ª instar larval, defecação, taxa de pupação, taxa de emergência e mortalidade. O tempo em cada fase de desenvolvimento, como a mudança na coloração de olhos das pupas também foi observado, os dados foram submetidos a análises estatísticas pertinentes, descritos no próximo tópico.

Figura 2. Representação das placas de criação *in vitro* dispostas em estufa incubadora B.O.D, a 28,7 C° e umidade de 95±5% nos primeiros dias.



Fonte: Autoria própria

4.4.4. Análises estatísticas

Os dados não atenderam aos pressupostos das análises de variância (ANOVA), normalidade dos resíduos e homogeneidade, conforme os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Então, foram analisados por construção de modelos lineares generalizados (GLM).

Foram analisadas as taxas de mortalidade, pupação e a emergência dos adultos, entre os grupos controle e expostos. Para os seguintes dados foram calculadas a média e o erro padrão: (1) mortalidade das larvas/número inicial de

larvas; (2) pupas de olho branco/número inicial de larvas; (3) emergência das abelhas /número de pupas; e (4) emergência das abelhas/número inicial de larvas.

A distribuição utilizada foi a binomial para as taxas de mortalidade larval, pupação e emergência com relação ao número inicial de larvas. Para as taxas de emergência com relação ao número de pupas vivas foi utilizada a distribuição de quasipoisson. A adequabilidade dos dados em relação ao modelo foi conferida por meio da análise de resíduos utilizando o pacote HNP (MORAL, *et al.*, 2017). A comparação dos grupos foi realizada pela análise de deviance e o efeito pelo pós teste utilizando o ajuste de Tukey, sendo o nível de significância o valor de $p < 0,05$.

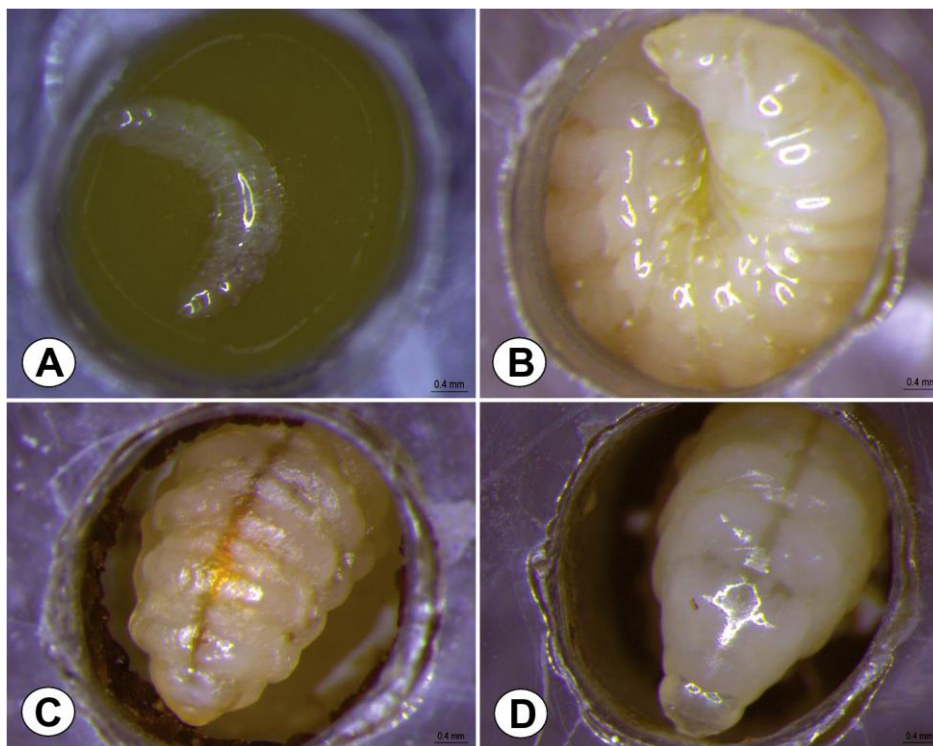
O tempo em cada fase de desenvolvimento durante a metamorfose foi analisado por meio de curvas de Kaplan-meier, os pacotes utilizados foram o survival e survminer (THERNEAU, 2022; TERRY, 2000; KASSAMBARA, *et al.*, 2021). A comparação dos grupos foi feita pela regressão de cox e o pós teste pelo ajuste de Tukey. Para os dados mencionados foi analisado o tempo nas fases: 5º instar, defecação, pupa de olho branco, pupa de olho rosa, pupa de olho marrom, pupa de olho preto e o tempo de emergência dos adultos. As análises foram realizadas no software estatístico RStudio versão 4.2.0 (R CORE TEAM, 2022).

4.5. RESULTADOS

4.5.1. Médias das taxas de mortalidade e desenvolvimento

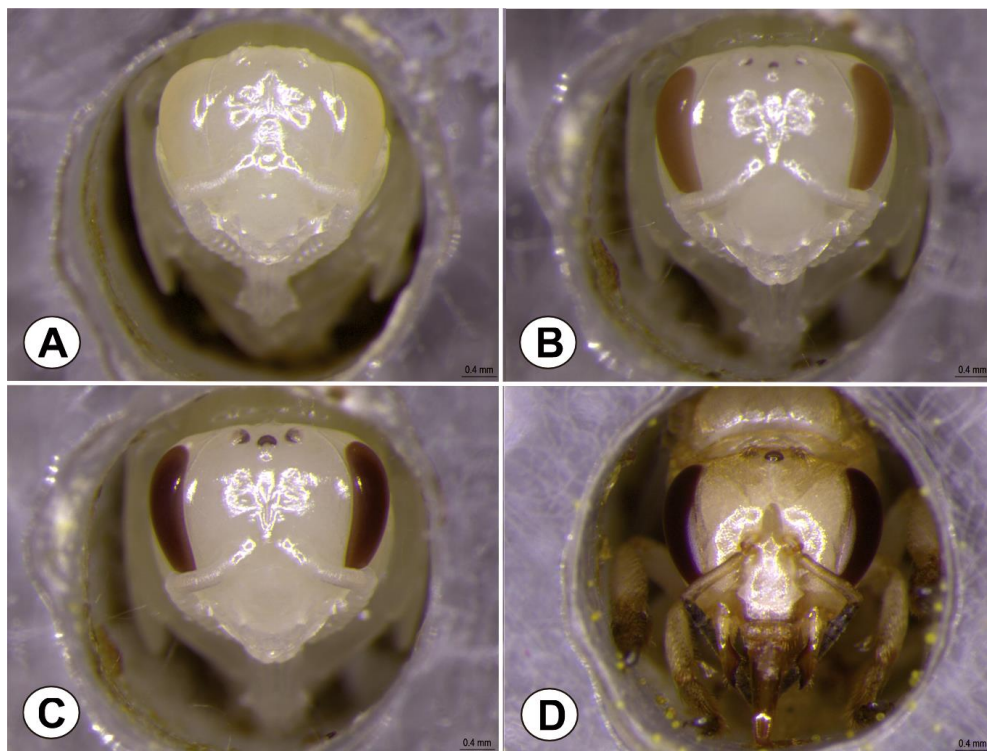
Durante a realização dos bioensaios, foi possível acompanhar a progressão do desenvolvimento de *S. postica* em condições laboratoriais, conforme é apresentado nas figuras 3 e 4. Entre os grupos controle e controle solvente (acetona) não houve diferença estatística para mortalidade larval, taxa de pupação, emergência/larvas e emergência/pupas. Contudo, os grupos expostos as concentrações de clotianidina apresentaram significância estatística para mortalidade de larvas, pupação e emergência/larvas em comparação com os grupos controle e controle solvente. A taxa de emergência/pupas não apresentou significância estatística entre nenhum dos grupos (Tabela 1).

Figura 3. Progressão do desenvolvimento larval de *S. postica*.



Fonte: Autoria própria. (A) Larva em 1° instar, 24h após a eclosão do ovo; (B) Larva em 5° instar após o término da alimentação; (C) Larva defecante; e (D) Pré-pupa.

Figura 4. Fases de desenvolvimento no período pupal.



Fonte: Autoria própria. (A) Pupa de olho branco; (B) Pupa de olho rosa; (C) Pupa de olho marrom; e (D) Pupa de olho preto.

Tabela 1. Mortalidade da fase larval, taxa de pupação e taxa de emergência com relação a larvas e pupas (média \pm erro padrão) de *S. postica*.

| Grupos | Mortalidade de larvas (%) | Pupação (%) | Emergência/ larvas (%) | Emergência/ pupas (%) |
|-------------------|---------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
| Controle | 0 \pm 0 a | 98.88 \pm 1.1 a | 96.6 \pm 0 a | 97.7 \pm 1.1 a |
| Controle solvente | 1.1 \pm 1.1 a | 97.77 \pm 1.1 a | 93.3 \pm 1.92 a | 95.44 \pm 1.16 a |
| 0.1 ng/ μ L | 20 \pm 5.7 b | 75.55 \pm 4.4 b | 73.3 \pm 6.6 b | 96.66 \pm 3.3 a |
| 1 ng/ μ L | 33.33 \pm 6.93 b | 64.44 \pm 7.7 b | 62.2 \pm 7.28 b | 96.65 \pm 1.74 a |

Taxa de mortalidade de larvas: número de larvas mortas / número inicial de larvas da amostra; taxa de pupação/ larvas: número de pupas de olho branco/ número inicial de larvas da amostra; taxa de emergência/ larvas: número de abelhas emergidas / número inicial de larvas da amostra; taxa de emergência/ pupas: número de abelhas emergidas / número amostral de pupas vivas. A ocorrência de letras distintas entre os grupos indica significância estatística ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos demonstraram que os grupos expostos a clotianidina apresentaram uma redução significativa na sobrevivência das abelhas em comparação aos grupos controle (Tabela 1). Os grupos 0,1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L apresentaram taxas de mortalidade de larvas de 20% e 33,33%, respectivamente, enquanto que os controles, 0 e 1,1%.

A taxa de pupação representa todos os indivíduos que atingiram a fase pupa de olho branco após o período larval. Os grupos expostos 0,1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L apresentaram taxas abaixo do normal em comparação aos grupos controle, sendo 75,55% e 64,44%, respectivamente.

A taxa de emergência com relação ao número inicial de larvas transferidas foi maior que 93% em ambos os grupos controle. Contudo, os expostos apresentaram taxas abaixo de 73%. Em contrapartida, a taxa de emergência com relação ao número amostral de pupas vivas foi maior que 90%, em todos os grupos experimentais.

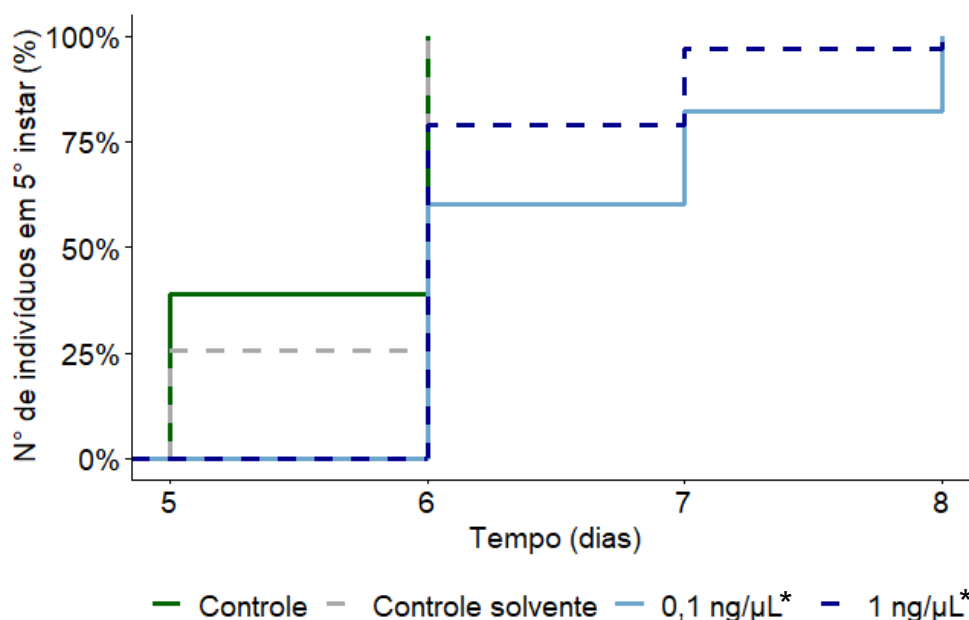
4.5.2. Tempo em cada fase de desenvolvimento

Os resultados obtidos do tempo em cada fase de desenvolvimento apresentaram significância estatística para o 5ª instar larval (Figura 5) e defecação

(Figura 6). Os grupos expostos demonstraram um atraso para atingir o 5^a instar larval em comparação aos grupos controle e controle solvente (acetona). Já os dados obtidos para o tempo em que os indivíduos defecaram, a concentração de campo de 1 ng/ μ L apresentou um pico no 8^o dia, demonstrando um adiantamento na defecação de mais de 75% dos indivíduos. Enquanto que os grupos controle e controle solvente, defecaram gradativamente entre o 7^o, 8^o e 9^o dia. A concentração subletal 0,1 ng/ μ L, não teve diferença estatística entre os controles durante a defecação, apenas com a concentração mais alta de clotianidina.

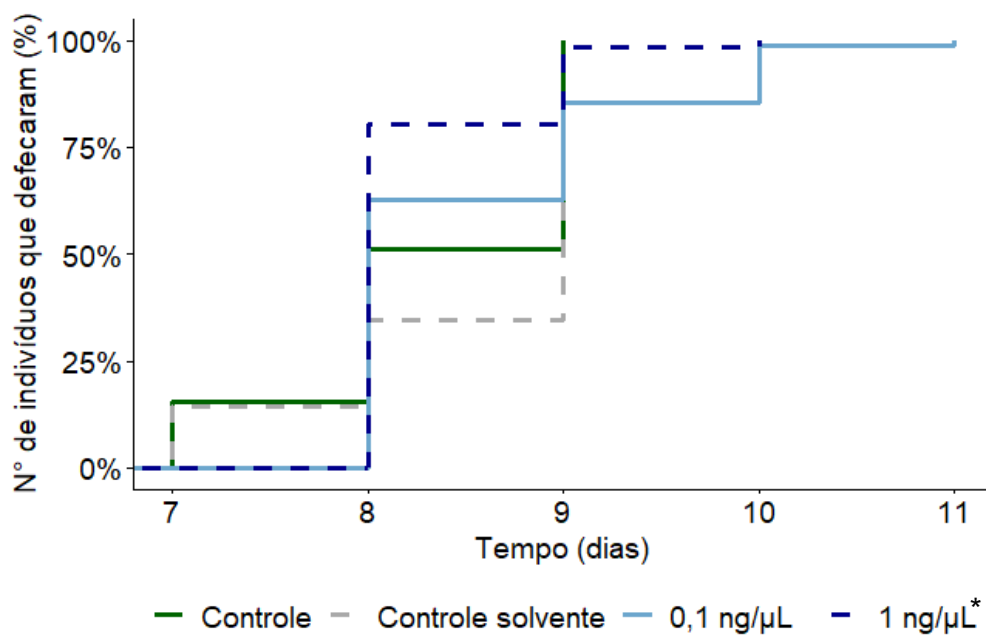
Não houve diferença estatística no tempo de desenvolvimento entre os grupos durante o período pupal e a emergência dos indivíduos, apenas em pupa de olho marrom (Figura 9). Os grupos expostos a clotianidina atingiram pupa de olho marrom com 1 dia de atraso em relação aos grupos controle e controle solvente. No 23^o dia os controles apresentaram maior pigmentação de olho marrom, enquanto que os grupos 0,1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L apresentaram essa pigmentação apenas no 24^o dia.

Figura 5. Tempo em que os indivíduos atingiram o 5^a instar larval



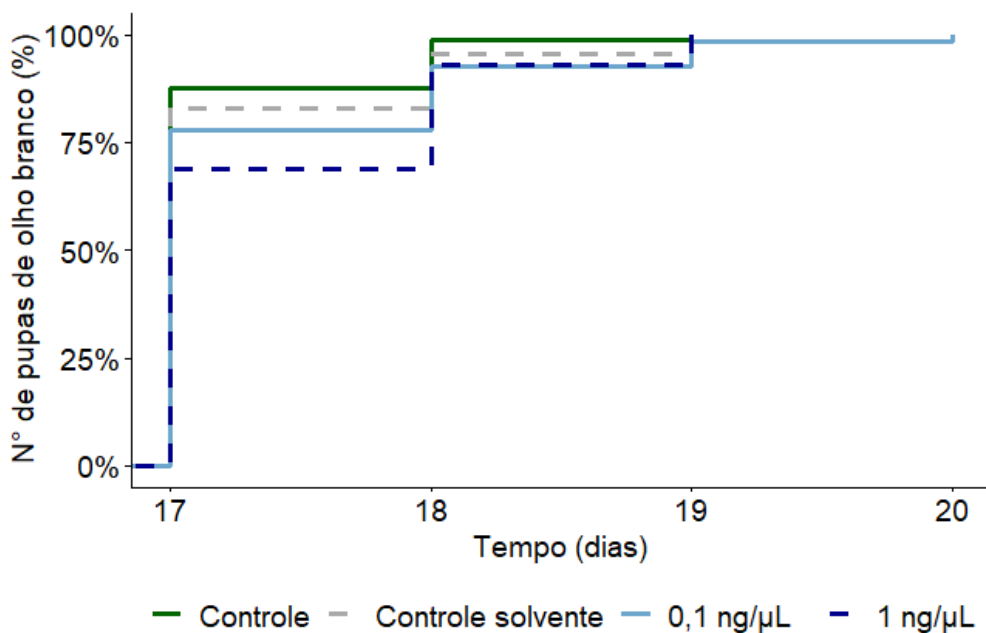
O gráfico ilustra o tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram o determinado evento. Asteriscos denotam diferenças significativas dos grupos expostos comparados com os respectivos grupos controles (*p < 0.05).

Figura 6. Tempo em que os indivíduos defecaram



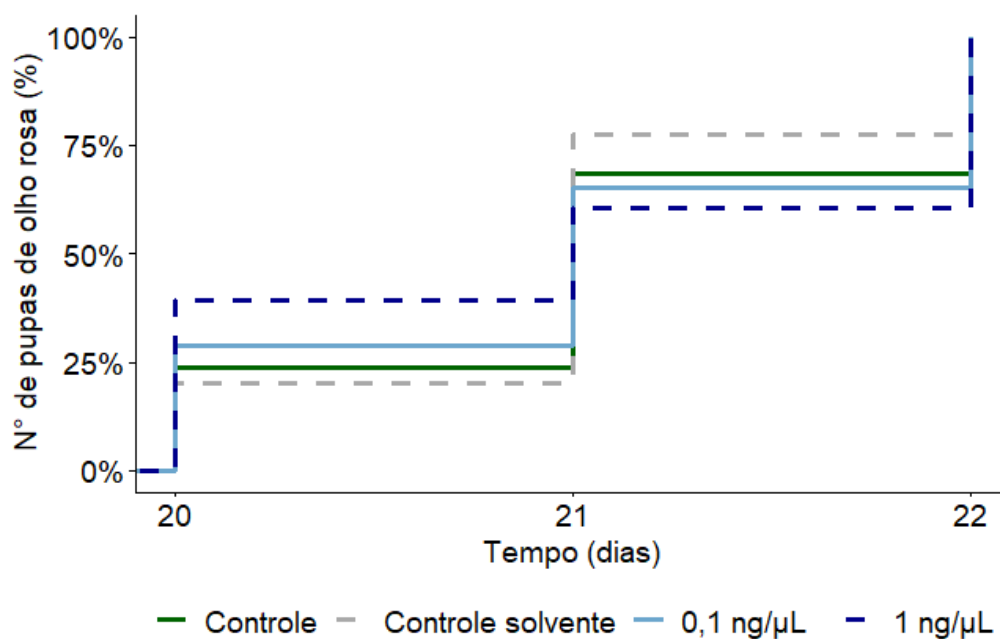
O gráfico ilustra o tempo (em dias) que os indivíduos (%) defecaram. Asteriscos denotam diferenças significativas dos grupos expostos comparados com os respectivos grupos controles (* $p < 0.05$).

Figura 7. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho branco



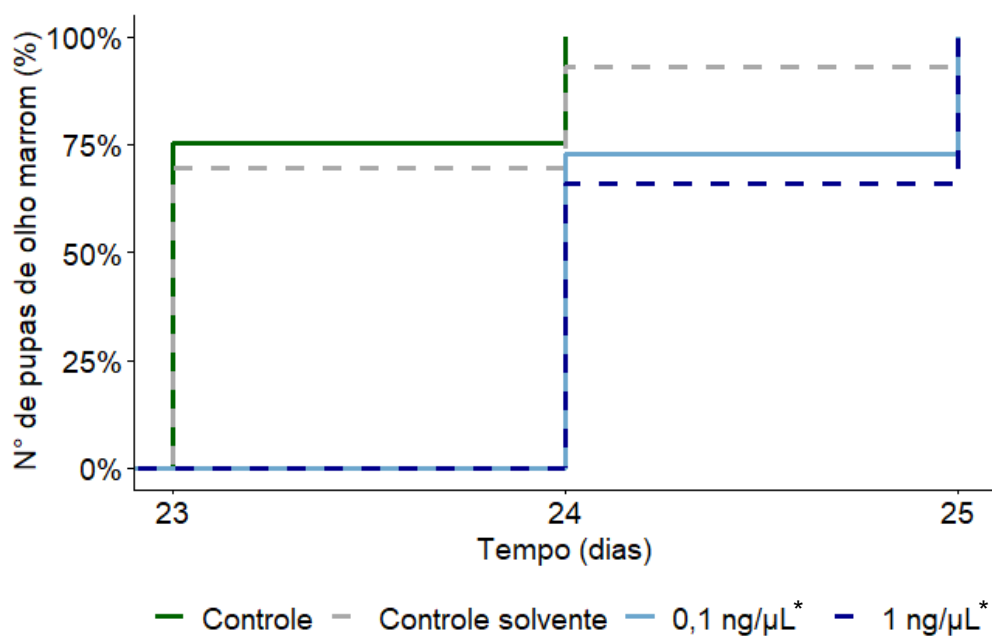
O gráfico ilustra o tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram o determinado evento.

Figura 8. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho rosa



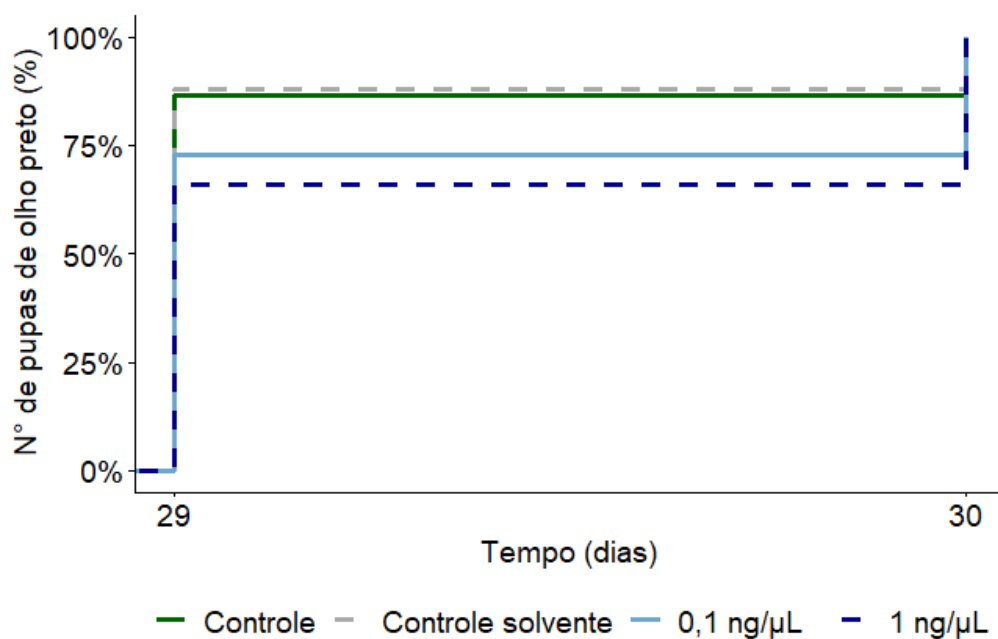
O gráfico ilustra o tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram o determinado evento.

Figura 9. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho marrom



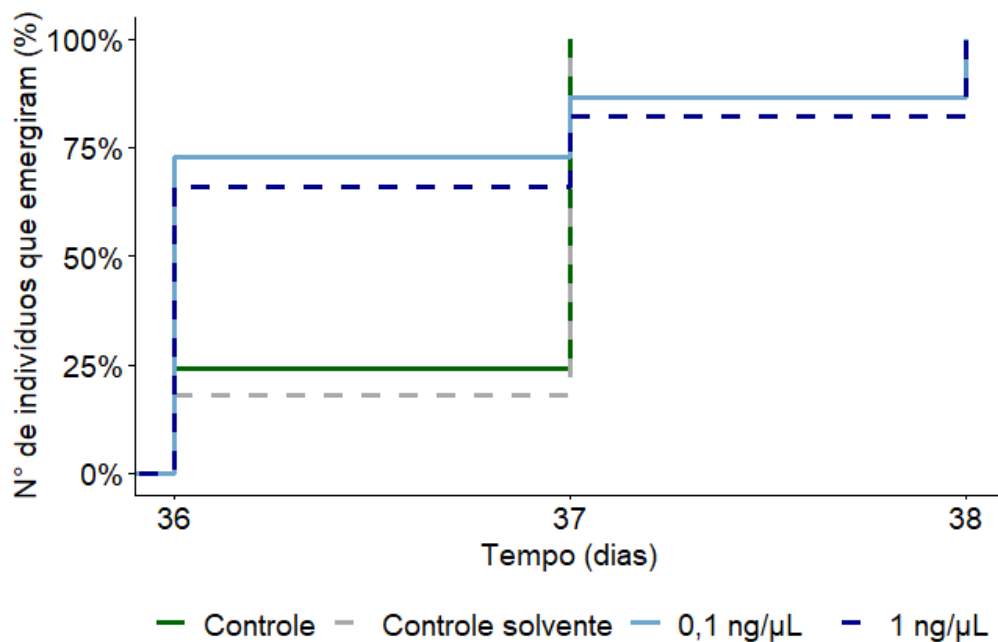
O gráfico ilustra o tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram determinado evento. Asteriscos denotam diferenças significativas dos grupos expostos comparados com os respectivos grupos controles (* $p < 0.05$).

Figura 10. Tempo em que os indivíduos atingiram pupa de olho preto



O gráfico ilustra o tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram determinado evento.

Figura 11. Tempo em que os indivíduos emergiram



O gráfico ilustra o tempo (em dias) que os indivíduos (%) atingiram determinado evento.

4.6. DISCUSSÃO

Os experimentos realizados neste trabalho apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 90% nos grupos controle. Atualmente, os métodos utilizados para bioensaios de toxicidade no Brasil, se baseiam nos protocolos padronizados pela OECD, que utiliza a espécie *A. mellifera* como organismo modelo. Esse protocolo propõe que para as placas controle, a mortalidade larval cumulativa deve ser menor ou igual a 15% nas réplicas (OECD, 2016). Em nossos estudos as taxas de mortalidade larval foram 0% (controle) e 1,1% (controle solvente). Isso significa que esses resultados são promissores e podem ser considerados representativos para futuras aplicações em estudos de avaliação de risco de agrotóxicos em abelhas sem ferrão no estágio larval.

As taxas de mortalidade dos grupos expostos a 0,1 ng/μL e 1 ng/μL de clotianidina, apresentaram mortalidades significativas em comparação aos grupos controle, demonstrando o potencial toxicológico desse composto em larvas de abelhas *S. postica*. Em contrapartida, em estudos de Tadei *et al.* (2019), as larvas de *A. mellifera* não apresentaram sensibilidade à exposição a 0,2364 ng/larva de clotianidina, embora tenham demonstrado efeitos posteriores após a emergência. Esse dado reforça a hipótese de que larvas de abelhas sem ferrão podem apresentar maior sensibilidade e suscetibilidade aos efeitos de neonicotinoides do que as abelhas de gênero *Apis*.

Alguns estudos sugerem que larvas de abelhas são mais tolerantes a neonicotinoides do que abelhas adultas (DAI *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2012). No entanto, nossos resultados com larvas de *S. postica* demonstraram o oposto em comparação com esses estudos, as larvas apresentaram maior sensibilidade ao inseticida. Já para Osterman *et al.* (2019), o tratamento de sementes com clotianidina não demonstrou impacto negativo sobre abelhas adultas *A. mellifera* em campo. Contudo, a clotianidina foi mais tóxica para as larvas de *S. postica*, desse modo, pode-se inferir que abelhas adultas *A. mellifera* são muito mais tolerantes do que as larvas de abelhas sem ferrão.

As concentrações utilizadas neste trabalho também foram encontradas em diversos estudos e em condições realísticas de campo. (HERNANDO *et al.*, 2018; SCHNEIDER *et al.*, 2012). Alkassab e Kirchner (2018) administraram concentrações de 0,1 a 2 ng/abelha do neonicotinoide clotianidina e avaliaram como a exposição oral aguda influencia a atividade locomotora de abelhas adultas *A. mellifera*, em um

experimento de curso de tempo. Efeitos significativos nos parâmetros testados foram observados na concentração de 0,5 e 2 ng/abelha. A concentração mais baixa (0,1 ng/abelha) não apresentou efeitos significativos na atividade motora das abelhas.

Por outro lado, as concentrações de 0,1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L apresentaram efeitos negativos nas larvas em nosso estudo, isso significa que mesmo em baixas concentrações a clotianidina pode provocar impactos nas fases de desenvolvimento de *S. postica*, enquanto que em abelhas adultas *A. mellifera* não apresenta efeitos nessas concentrações. Esses dados contribuem com o argumento de que abelhas *Apis* não são representativas de outras abelhas nativas sem ferrão em estudos ecotoxicológicos.

Os resultados das taxas de pupação representam a média relativa da quantidade de pré-pupas que atingiram a fase de pupa de olho branco. Os grupos expostos tiveram taxas insuficientes e abaixo de 75,5%, em comparação com o grupo controle e controle solvente, que apresentaram taxas superiores a 95%. Já as taxas de emergência com relação ao número inicial de larvas também apresentaram significância estatística entre as duas concentrações de clotianidina e os grupos controle. A redução na taxa de pupação implica na redução na taxa de emergência, podendo afetar a saúde e a abundância dos indivíduos a nível de colônia. Com base nesses dados, fica clara a toxicidade da clotianidina para as abelhas deste estudo, mesmo quando são administradas baixas concentrações.

Outros estudos observaram a toxicidade do tiametoxam, precursor da clotianidina, na sobrevivência de larvas e pupas de abelhas. Como é o caso do estudo realizado por Tavares *et al.* (2017), que observou uma redução na sobrevivência de larvas e pupas expostas a 1,44 ng/ μ L de tiametoxam; Rosa *et al.* (2016) também observou essa redução na sobrevivência larval ao expor as abelhas *Scaptotrigona aff. depilis* Moure, 1942 a 0,044 ng/larva de tiametoxam.

Todavia, as médias das taxas de emergência com relação ao número de pupas não apresentaram significância estatística entre nenhum grupo experimental. Uma vez que essa taxa leva em consideração apenas a quantidade de pupas vivas em determinado estágio, e não o número amostral inicial de indivíduos do experimento. Essa semelhança entre os grupos pode ser explicada pelo fato de os resíduos metabólicos serem armazenados na larva até o 5^o instar larval, após esse período os indivíduos defecam e podem eliminar as excretas contendo os ingredientes ativos (ZHU *et al.*, 2014). Com base nessas análises, pode-se inferir

que a clotianidina foi potencialmente mais tóxica durante o período larval do que o pupal.

Os resultados do tempo de desenvolvimento em cada fase apresentaram significância estatística no 5º instar larval. Os grupos expostos demonstraram atraso de 1 dia e só entraram em 5º instar após os grupos do controle. Esse fato pode ser explicado pela ação da clotianidina no desenvolvimento pós-embriônico, uma vez que os neonicotinoides podem acumular-se no corpo gorduroso da larva, resultando em um estresse contínuo ao longo do desenvolvimento. A diferença entre as larvas e os adultos é que uma abelha adulta pode excretar esses resíduos tóxicos por meio da defecação regular, já as larvas só vão excretar os produtos da digestão após o término da alimentação e o desenvolvimento completo no último instar larval (FENG *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2014).

As taxas de defecação demonstraram diferenças significativas entre a concentração de campo de 1 ng/μL e os demais grupos experimentais (controle, controle solvente e 0,1 ng/μL). O grupo exposto a 1 ng/μL apresentou um adiantamento na defecação de mais de 75% dos indivíduos, enquanto que os outros grupos defecaram gradativamente. Esse resultado pode ser explicado pela hipótese de desenvolvimento anormal e metamorfose precoce da larva, especialmente pela exposição a concentração mais alta de clotianidina. Uma vez que esses produtos possuem mecanismos de ação nas funções endócrinas de insetos e podem inibir a sinalização do hormônio juvenil, responsável por regular a duração do estágio larval. Como o HJ possui um importante papel no desenvolvimento, reprodução, diapausa e outros processos fisiológicos, os inseticidas agonistas de HJ e ecdisona interrompem fatalmente os sinais endócrinos, alterando a manutenção da metamorfose (KAYUKAWA *et al.*, 2020; CHOI; JE, 2022). Com base nessas informações, presume-se que os efeitos ocasionados pela clotianidina podem ter provocado o desenvolvimento anormal dos indivíduos no presente estudo. Embora não se saiba com exatidão, mais investigações são necessárias a nível molecular.

A duração em cada fase de desenvolvimento é muito influenciada pelas condições ambientais, especialmente pela alimentação. Internamente, as larvas possuem um tubo digestório, os compartimentos desse tubo podem ser divididos entre a passagem do intestino médio e o posterior, esses compartimentos permanecem fechados durante toda a fase larval. Mas na metade do 5º instar larval conectam-se quando a larva termina de se alimentar. A abertura dos

compartimentos é marcada pela defecação, quando todos os resíduos alimentares acumulados passam do intestino médio para o posterior e são eliminados (CRUZ-LANDIM, 2009). Desse modo, infere-se que a clotianidina pode ter influenciado no sistema endócrino e, conseqüentemente, no desenvolvimento precoce do sistema digestório. Alterando o curso de tempo da metamorfose e induzindo as larvas expostas a concentração mais alta a defecação precoce.

Os resultados no tempo de desenvolvimento entre os grupos durante o período pupal e emergência dos indivíduos não apresentaram diferenças estatísticas, apenas em pupa de olho marrom. Isso significa que os grupos expostos a clotianidina entraram em pupa de olho branco junto aos grupos do controle. O mesmo ocorreu na fase de pupa de olho rosa. No entanto, em pupa de olho marrom houve uma grande variação, as abelhas expostas a 0,1 ng/μL e 1 ng/μL de clotianidina atingiram pupa de olho marrom com 1 dia de atraso em relação aos dois controles. Mas o tempo de duração nas fases de olho preto e durante a fase de emergência não demonstraram diferenças significativas. As pupas que atrasaram na fase de olho marrom foram capazes de atingir pupa de olho preto e de emergirem ao mesmo tempo que os grupos do controle. Tais variações podem ser explicadas novamente pela desregulação no curso da metamorfose, atrasando ou adiantando os estágios.

O controle da metamorfose é induzido e regulado por ecdisteróides, na ausência ou sob baixos estímulos do hormônio juvenil. Os fatores que desencadeiam a muda são pouco compreendidos, mas presume-se que haja a participação do sistema nervoso central, via estímulos nervosos. Os quais são responsáveis por desencadear uma cascata de sinais sobre os tecidos e órgãos que sintetizam os hormônios (CRUZ-LANDIM, 2009).

A clotianidina atua como um modulador competitivo dos receptores nicotínicos da acetilcolina e causa hiperexcitação do sistema nervoso central do inseto (GYŐRI *et al.*, 2017; UNEME *et al.*, 2006). Contudo, os mecanismos moleculares que afetam o desenvolvimento e a pupação de larvas não são totalmente compreendidos em neonicotinoides. Li *et al.* (2021) investigaram a resposta do hormônio juvenil às concentrações de tiametoxam e evidenciaram que esse composto aumentou significativamente os níveis do hormônio em larvas de abelhas. Essas alterações podem prejudicar o desenvolvimento desses insetos e alterar os cursos regulatórios da metamorfose.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a clotianidina provocou efeitos adversos em todos os estágios de desenvolvimento da espécie de abelha *S. postica*, principalmente no período larval. Como os agrotóxicos são produtos químicos desreguladores endócrinos e podem afetar significativamente o crescimento, o desenvolvimento e os sistemas reprodutivos de organismos (QIAN *et al.*, 2022), maiores investigações são necessárias a fim de esclarecer com exatidão como, e se essa desregulação no tempo do desenvolvimento larval pode gerar alterações e consequências posteriores quando as larvas virem a tornarem-se abelhas adultas.

4.7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a exposição a concentrações ambientalmente relevantes de clotianidina pode afetar a sobrevivência e o desenvolvimento de abelhas *S. postica*, especialmente no período larval, onde a clotianidina demonstrou maior toxicidade. Os dados apresentados esclarecem o questionamento levantado pelo presente estudo, contribuem para o preenchimento de lacunas existentes no que se refere aos impactos desse inseticida e, portanto, podem ser considerados representativos para futuras aplicações em estudos de avaliação de risco ambiental de agrotóxicos em abelhas sem ferrão no estágio larval.

4.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALKASSAB, A.T.; KIRCHNER, W.H. Assessment of acute sublethal effects of clothianidin on motor function of honeybee workers using video-tracking analysis. Ecotoxicology and environmental safety, volume 147, p. 200-205, ISSN 0147-6513, 2018.
- BLACQUIÈRE, T.; VAN DER STEEN, J.J. Three years of banning neonicotinoid insecticides based on sub-lethal effects: can we expect to see effects on bees? Pest. Manag. Sci., 73: 1299-1304. < <https://doi.org/10.1002/ps.4583> >, 2017.
- BONMATIN, J.M. *et al.* Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 35–67, 2015.
- BOTÍAS *et al.* Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. Environ. Sci. Technol. 49, 12731–12740, 2015.
- BEYER, M. *et al.* Pesticide residue profiles in bee bread and pollen samples and the survival of honeybee colonies—a case study from Luxembourg. Environmental Science and Pollution Research, v. 25, n. 32, p. 32163–32177, nov. 2018.
- CARNEIRO, F., *et al.* Os impactos dos agrotóxicos na saúde, trabalho e ambiente no contexto do agronegócio no Brasil. Rio de Janeiro: Abrasco, 2014.
- CARNEIRO, F., *et al.* *Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.
- CHOI, J. Y.; JE, Y.H. Insect Juvenile Hormone Antagonists as Eco-friendly Insecticides. Korean journal of applied entomology, v. 61, n. 1, p. 101-108, 2022.
- DAI, P. *et al.* Acute toxicity of five pesticides to *Apis mellifera* larvae reared *in vitro*. Pest Management Science. <https://doi.org/10.1002/ps.4608>, 2017.
- DELAPLANE, K.S., MAYER, D.F. Crop pollination by bees. CABI publishing, 2000.
- DORIGO, A.; ROSA-FONTANA, A.; CAMARGO, I.; NOCELLI, R.; MALASPINA, O. Biological Data of Stingless Bees with Potential Application in Pesticide Risk Assessments. Sociobiology, v. 65, p. 777, 2018.
- EFSA, European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. EFSA J. 11, 3066, 2013a.
- EFSA, European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance imidacloprid. EFSA J. 11, 3068, 2013b.
- EFSA, European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance thiamethoxam. EFSA J. 11, 3067, 2013c.

EFSA, European Food Safety Authority. Towards an integrated environmental risk assessment of multiple stressors on bees: review of research projects in Europe, knowledge gaps and recommendations. EFSA J. 12, 3594, 2014.

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

FREE, J.B. Insect pollination of crops. Academic Press, London-New York, 1993.

FREITAS, B.M.; BOMFIM, I.G.A. A necessidade de uma convivência harmônica da agricultura com os polinizadores. In: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Importância dos polinizadores na produção de alimentos e na segurança alimentar global. Brasília: CGEE; p. 39-50, 2017.

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

HERNANDO, M.D., *et al.* Viability of honeybee colonies exposed to sunflowers grown from seeds treated with the neonicotinoids thiamethoxam and clothianidin. Chemosphere, 2018.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Manual de Avaliação de Risco Ambiental de Agrotóxicos para Abelhas. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/reavaliacaoambiental/2017/2017-07-25-Manual-IBAMA-ARA-Abelhas-IN0217-WEB.pdf>, 2017.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Avaliação de risco ambiental do ingrediente ativo Clotianidina para insetos polinizadores. Parecer técnico n.º 2. Reavaliação ambiental. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/consultas-publicas/2269-consulta-publica-sobre-reavaliacao-ambiental-do-ingrediente-ativo-clotianidina-para-insetos-polinizadores>>, 2021.

LI, H. *et al.* Juvenile hormone and transcriptional changes in honey bee worker larvae when exposed to sublethal concentrations of thiamethoxam. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 225, p. 112744, 2021.

LIMA, M. A. P. *et al.* Agrochemical induced stress in stingless bees: peculiarities, underlying basis, and challenges. Journal of Comparative Physiology, vol. 202, p.1-15, 2016.

KASSAMBARA, A., KOSINSKI., M, BIECEK, P. Survminer: Drawing Survival Curves using “ggplot2”. R package version 0.4.9, <<https://CRAN.R-project.org/package=survminer>>. 2021.

KAYUKAWA, T. *et al.* Identification of a juvenile-hormone signaling inhibitor via high-throughput screening of a chemical library. Sci Rep 10, 18413 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75386-x>, 2020.

KEVAN, P.G., *et al.* High quality bee products are important to agriculture: why, and what needs to be done. J Apic Res 46:59–64. doi:10.3896/IBRA.1.46.1.11, 2007.

KLEIN, A. M. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proceedings of the Royal Society – Biological Sciences, v. 274, p. 303-313, 2007.

MICHENER, C.D. Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees, New York: Springer. p.654, 2013.

MILFONT, M.O., *et al.* Higher soybean production using honeybee and wild pollinators: a sustainable alternative to pesticides and autopollination. Environmental Chemistry Letters ;11:335-341, 2013.

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

OECD Guidance document on honeybee larval toxicity test following repeated exposure, Series on Testing and Assessment N. 239, 2016.

OSTERMAN, J., WINTERMANTEL, D., LOCKE, B. *et al.* Clothianidin seed-treatment has no detectable negative impact on honeybee colonies and their pathogens. Nat Commun 10, 692. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08523-4>, 2019.

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

QIAN, Z. *et al.* Research Progress on Toxic Effects of Typical Pesticides Endocrine Disruptor on Aquatic Flea. Asian Journal of Ecotoxicology, n. 1, p. 137-149, 2022.

RANCAN, M.; ROSSI, S.; SABATINI, A. G. Determination of Thiamethoxam residues in honeybee by high performance liquid chromatography with an electrochemical detector and post-column photochemical reactor. Journal of Chromatography A, Amsterdam, v.1123, p.60-65. 2006.

RAIMETS, R. *et al.* Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory. Chemosphere, v. 238, jan. 2019.

ROSA-FONTANA, A. DE S., *et al.* What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. Environmental pollution, v. 265, p. 114849, 2020.

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

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing. <https://CRAN.R-project.org/doc/FAQ/R-FAQ.html>. 2022.

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

SCHNEIDER, C.W. *et al.* RFID Tracking of Sublethal Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on the Foraging Behavior of *Apis mellifera*. PLoS ONE, 7(1): e30023. 2012.

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. Sci Rep. doi: 10.1038/s41598-019-39383-z. 1 Mar, 2019.

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

TERRY, M., THERNEAU, P. M. Grambsch. Modeling Survival Data: Extending the Cox Model. Springer, New York. ISBN 0-387-98784-3, 2000.

THERNEAU, T. A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.3-1, <https://CRAN.R-project.org/package=survival>, 2022.

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

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

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

US-EPA, White Paper in Support of the Proposed Risk Assessment Process for Bees. Submitted to the FIFRA Scientific Advisory Panel for Review and Comment. September p. 11-14, 2012, June 23, 2014.

VELTHUIS, B. J., VELTHUIS, H. H. W. Columbus surpassed: biophysical aspects of how stingless bees place an egg upright on their liquid food. Naturwissenschaften, 85(7), 330-333, 1998.

YAN, E.C. *et al.* Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. PLoS One 7: e49472, 2012.

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

5. CAPÍTULO 2

Toxicidade da clotianidina na morfologia e atividade enzimática de órgãos de metabolização de substâncias de abelhas recém emergidas *Scaptotrigona postica*

Isabella F. Camargo^{1*}, Annelise S. Rosa-Fontana¹, Roberta C. F. Nocelli².

¹Centro de Estudos de Insetos Sociais - CEIS, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-SP), Rio Claro, SP, Brasil.

²Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar-SP), Araras, SP, Brasil.

5.1. INTRODUÇÃO

As abelhas são os principais polinizadores em ecossistemas agrícolas e naturais. Desse modo, a conservação de habitats depende da preservação das populações desses insetos, pois se eles desaparecerem, a reprodução da flora pode ser severamente limitada (MICHENER, 2000). Estima-se que no mundo, existam mais de 20.000 espécies de abelhas. As regiões tropicais e subtropicais abrigam a maior parcela desses polinizadores. (SILVA *et al.*, 2014).

O gênero *Scaptotrigona* (Apidae: Meliponinae) é composto por 22 espécies de abelhas sem ferrão (FERNÁNDEZ, 2008). Dentre elas, a *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807), conhecida popularmente como mandaguari preta ou timba-amarella, possui distribuição geográfica em regiões neotropicais como a Bolívia, em diversos Estados do Brasil e no Peru (CAMARGO; PEDRO, 2013).

A importância de realizar estudos com espécies de abelhas sem ferrão se dá pela sua eficiência na polinização e por serem consideradas polinizadores-chave para várias espécies de plantas e culturas agrícolas economicamente importantes (HEARD, 1999, SLAA *et al.*, 2006). No Brasil, dependendo o ecossistema considerado, 40 a 90% das plantas nativas são polinizadas por essas abelhas, e características como o hábito, comportamento e biologia das espécies justificam essa eficiência, principalmente por desempenharem papéis únicos e específicos nos ecossistemas (KERR *et al.*, 1996; WITTER *et al.*, 2014).

Sabe-se que as abelhas eussociais forrageiam em busca de diferentes fontes para coletar e armazenar pólen (RAMALHO *et al.*, 1989; GOODMAN, 2003; MICHENER, 2007). É durante essas atividades diárias de forrageamento que muitos indivíduos são expostos a diferentes tipos de xenobióticos em áreas cultivadas. Em vista disso, acabam levando pólen e néctar contaminados até a colônia, recursos estes que são necessários para a produção do alimento das larvas e adultos (BEYER *et al.*, 2018; CHARPENTIER *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014).

Algumas classes de agrotóxicos são mais persistentes no ambiente e seus resíduos ficam acumulados no solo, água e no pólen e néctar das plantas, como é o caso da clotianidina (CHAM *et al.*, 2020). Há diversos registros de resíduos de agrotóxicos em “*bee bread*”, conhecido como pão de abelha (KRUPKE *et al.*, 2012; LENTOLA *et al.*, 2017; SKERL *et al.*, 2009; SIMON-DELSO *et al.*, 2017).

Luz e colaboradores (2019), observaram que mesmo em áreas com vegetação nativa preservada, *S. postica* visitava com frequência plantas exóticas, cultivadas e introduzidas para fins paisagísticos no entorno. A contaminação por ingredientes ativos observada em amostras de “*bee bread*” do estudo, foram prováveis consequências desse comportamento.

Entre os resíduos encontrados com mais frequência em recursos coletados por abelhas, estão os neonicotinoides clotianidina, tiametoxam, tiacloprido, imidacloprido e acetamiprido. Um grupo químico com enorme potencial toxicológico para oferecer risco à saúde das populações de abelhas (GOULSON, 2013; SCHMUCK; LEWIS, 2016; SILVINA *et al.*, 2017; TSVETKOV *et al.*, 2017; SÁNCHEZ-BAYO *et al.*, 2017).

Quando expostas a esses produtos, as abelhas podem apresentar perda de memória e alterações comportamentais que dificultam a reprodução, polinização e a capacidade de retornar à colônia. (DESNEUX *et al.*, 2007; FAUSER-MISLIN *et al.*, 2014; FELTHAM *et al.*, 2014; HENRY *et al.*, 2012). Essa exposição também pode causar alterações a nível celular, que, dependendo do grau de reversibilidade, podem comprometer a viabilidade do tecido e órgão da abelha, podendo levar à morte (GRELLA *et al.*, 2019). Com base nessa problemática, diversos estudos observaram efeitos adversos em larvas e adultos de abelhas expostas a neonicotinoides (CATAE *et al.*, 2014; COSTA *et al.*, 2015; TADEI *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2019).

Apesar dos riscos oferecidos a esses agentes polinizadores, a comercialização do neonicotinoide clotianidina tem aumentado desde 2014 (IBAMA, 2021). As abelhas podem ser expostas a esse produto por meio da deriva da poeira de sementes tratadas, tanto em áreas de cultivo quanto em áreas adjacentes atingidas pela aplicação. Como também pelo consumo de pólen, néctar e fluído de gutação com deposição da poeira de sementes tratadas ou que cresceram a partir delas e do solo contaminado por clotianidina (CHAM *et al.*, 2020).

Em casos de exposição por via oral, o primeiro órgão a entrar em contato com o inseticida é o intestino, considerado o estômago funcional das abelhas. O intestino é responsável pela digestão dos alimentos e absorção dos produtos provenientes dessa digestão. Internamente, o epitélio intestinal é constituído por alguns tipos celulares específicos. As células denominadas principais ou digestivas são as mais abundantes em quantidade e possuem o papel de sintetizar enzimas digestivas e absorver nutrientes; já as células regenerativas são indiferenciadas e responsáveis por substituir as células principais que foram eliminadas para o lúmen por desgaste e; as células endócrinas, encontradas na base do epitélio, possuem o importante papel de produzir peptídeos com ação hormonal (CRUZ-LANDIM, 2009; CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM *et al.*, 1999).

Qualquer alteração na parte básica e funcional do epitélio pode causar danos a integridade do órgão e, conseqüentemente, a saúde das abelhas. Em casos de exposição a inseticidas, depois de passar pelo intestino, os produtos da digestão seguem para a hemolinfa. Uma das rotas que o inseticida pode seguir é pelos túbulos de Malpighi. Os túbulos de Malpighi são órgãos formados por uma única camada de células epiteliais, sua função é produzir um filtrado a partir da hemolinfa, a qual possui contato direto com os túbulos pela cavidade do corpo. A excreção por meio dos túbulos envolve eliminar excretas e substâncias potencialmente tóxicas para fora do corpo, portanto, são extremamente importantes na desintoxicação e manutenção da homeostase (CRUZ-LANDIM, 2009).

Catae e colaboradores (2014), evidenciaram que o tiametoxam, precursor da clotianidina (NAUEN *et al.*, 2003), é citotóxico para o intestino médio e túbulos de Malpighi. No intestino médio, o dano foi mais evidente nas abelhas expostas ao inseticida no primeiro dia. Já os túbulos de Malpighi apresentaram alterações no oitavo dia de exposição das abelhas ao inseticida. Revelando que a exposição

contínua à concentração subletal de tiametoxam prejudicou órgãos que são utilizados durante o metabolismo de substâncias.

Em virtude do intestino médio e dos túbulos de Malpighi de larvas e adultos de abelhas estarem envolvidos na absorção e excreção de compostos químicos, avaliações de sua morfologia podem revelar alterações induzidas por estressores ambientais como agrotóxicos (SILVA-ZACARIN, 2010). Além das análises a nível celular, as investigações de outros tipos de biomarcadores de exposição a xenobióticos são de extrema importância. Uma vez que servem para indicar a severidade dos danos causados ao indivíduos mediante as respostas biológicas aos estressores, como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas e comportamentais (DEPLEDGE; FOSSI, 1994; DEPLEDGE *et al.*, 1995).

Com base nesse contexto, estudos dos padrões de resposta de biomarcadores a xenobióticos são de extrema importância. Badiou-Bénéteau e colaboradores (2012) investigaram a resposta de biomarcadores enzimáticos de exposição ao tiametoxam em abelhas *A. mellifera*. No referido trabalho as respostas dos biomarcadores revelaram que, mesmo na menor concentração administrada, a exposição ao tiametoxam provocou efeitos subletais e modificou a atividade de enzimas carboxilesterase (CaEs), glutationa-S-transferase (GST), catalase (CAT) e fosfatase alcalina (PAL).

Uma variedade de enzimas são comumente usadas como biomarcadores em inúmeras espécies, como as CaEs e GST (BADIOU-BÉNÉTEAU *et al.*, 2012). As CaEs estão envolvidas em vários processos metabólicos, mas também podem ser consideradas como enzimas desintoxicantes de fase I que hidrolisam principalmente ésteres carboxílicos não polares. (YU *et al.*, 1984; DARY *et al.*, 1990; GUNNING *et al.*, 1997).

A glutationa-S-transferase pertence a uma família multigênica de proteínas diméricas multifuncionais que desempenham um papel central na desintoxicação. A GST é uma enzima desintoxicante de fase II que catalisa a conjugação de glutationa reduzida (GSH) a um grande número de xenobióticos, resultando em mais compostos polares sendo excretados ou posteriormente metabolizados. Estão presentes principalmente no intestino médio de diferentes espécies de abelhas (MAXWELL, 1992; KETTERMAN *et al.*, 2001; DIAO *et al.*, 2006). Em uma análise bioquímica, as enzimas CaEs e GST foram capazes de desintoxicar as abelhas em baixas concentrações do neonicotinoide acetamiprido (BADAWY *et al.*, 2015).

Por outro lado, há as enzimas responsáveis pelo sistema de defesa antioxidante. Entre as que constituem os sistemas de prevenção ao estresse oxidativo, se encontram a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutatona peroxidase (GPx). Essas enzimas são responsáveis por agir conforme os mecanismos de prevenção, impedindo ou controlando, dentro dos limites fisiológicos, a formação de radicais livres e possíveis danos causados em decorrência da formação destes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; CLARKSON; THOMPSON, 2000; KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2010).

A G6PD é uma enzima encontrada em todos os organismos contemporâneos e em todos os tecidos, podendo ser muito antiga em evolução. A G6PD catalisa a primeira etapa de uma via de produção de pentoses fosfato, sendo uma importante fonte de NADPH, que é responsável por combater efeitos deletérios causados por radicais livres. Uma compreensão crescente da importância central da G6PD para a fisiologia celular é essa produção de NADPH, extremamente necessária por muitos sistemas celulares essenciais, incluindo as vias antioxidantes e para uma variedade de reações de desintoxicação. Por esse motivo, a G6PD é essencial para a sobrevivência celular (LUZZATO; BATTISTUZZI, 1985; STANTON, 2012).

Por último, a glutatona peroxidase (GPx), é uma importante enzima intracelular responsável pela quebra dos peróxidos de hidrogênio em água. Uma vez que sua função é evitar o acúmulo celular de peróxidos e danos gerados por radicais derivados de peróxidos, por meio da inibição do processo de peroxidação lipídica, protegendo as células do estresse oxidativo (GÓTH *et al.*, 2004; GILL; TUTEJA, 2010; DRINGEN, 2004).

Estudos dos padrões de resposta de biomarcadores a xenobióticos, especialmente em abelhas sem ferrão, são escassos na literatura. Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos nas respostas morfológicas e bioquímicas do intestino médio e túbulos de Malpighi de *S. postica*, após a exposição larval a clotianidina. Diante dessa escassez de dados, investigações desta natureza são extremamente importantes para indicar alterações induzidas por estressores. Em vista disso, esse trabalho é inédito por ser o primeiro a avaliar os efeitos da clotianidina na morfologia de tecidos, na modulação da atividade de enzimas de desintoxicação e de estresse oxidativo em abelhas *S. postica*.

5.2. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo responder duas questões relevantes: I) Os órgãos responsáveis pela rota de metabolização de substâncias (intestino médio e túbulos de Malpighi) em abelhas recém emergidas, apresentam alterações morfológicas em decorrência da exposição larval ao inseticida?, e II) A atividade de enzimas biomarcadoras do sistema de desintoxicação e de estresse oxidativo, nas células intestinais e nos túbulos de Malpighi de recém emergidas, sofre alterações em resposta a exposição do inseticida durante o período larval?

5.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base nas hipóteses levantadas os objetivos específicos foram:

- I) Avaliar a toxicidade da clotianidina na morfologia de tecidos de órgãos de metabolização de substâncias (intestino e túbulos de Malpighi) de recém emergidas; II) Analisar a atividade de enzimas de desintoxicação – carboxilesterase 3 (CaEs-3) e glutathione-S-transferase (GST); como também de enzimas biomarcadoras de estresse oxidativo – glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e glutathione peroxidase (GPx), nos órgãos supracitados de abelhas recém emergidas.

5.4. MATERIAL E MÉTODOS

5.4.1. Coleta do material biológico para os bioensaios in vitro

Favos de cria da espécie *S. postica* foram coletados de colônias não parentais no meliponário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Rio Claro (22°23' 48.851" S; 47° 32'38.234" W). Para as coletas foram selecionadas três colônias fortes, com grande número de indivíduos e rainha jovem. A coleta foi realizada respeitando intervalos de 40 dias para a recuperação e desenvolvimento de novas operárias, de modo que não prejudicasse a saúde e dinâmica das colônias. Dessa forma, foram coletados favos contendo ovos para a retirada do alimento larval e favos contendo larvas de primeiro instar (recém-eclodidas) para os bioensaios de criação in vitro.

5.4.2. Obtenção das concentrações ambientalmente relevantes de clotianidina

O ingrediente ativo utilizado foi a clotianidina PESTANAL® ($C_6H_8ClN_5O_2S$), padrão analítico Sigma-Aldrich, pureza $\geq 98,0\%$. Para os bioensaios de exposição foram utilizadas concentrações realísticas de campo, considerando o pior cenário de aplicação. Para tanto, foram observadas as características recomendadas pelo produto comercial, para quais culturas o produto é indicado, quais as concentrações utilizadas e qual o modo de aplicação.

Com base nesses dados, foi utilizada a planilha BeeRex (Bee = abelha; REX = exposição de resíduos) utilizada pelo IBAMA e desenvolvida pela US-EPA (United States Environmental Protection Agency), para estimar o valor de resíduos capazes de alcançar os recursos florais a partir da dose comercial, considerando a aplicação para tratamento de sementes. Foram utilizadas duas concentrações na ordem de ng/microlitro, uma concentração de campo e uma concentração de campo/10 (representando uma concentração subletal), sendo 1 ng i.a./ μL e 0,1 ng i.a./ μL , respectivamente. Ambas as concentrações residuais estimadas pela planilha também foram encontradas em condições realísticas de campo em diversos estudos na literatura. (HERNANDO *et al.*, 2018; SCHNEIDER *et al.*, 2012; ALKASSAB; KIRCHNER, 2018).

5.4.3. Bioensaios de exposição a clotianidina

Com base nas concentrações obtidas, foi realizado o preparo de uma solução estoque contendo 10 mg de clotianidina para 10 mL de alimento larval (1/1), relação de massa e volume (m/v). No entanto, a clotianidina não é solúvel em água, em vista disso, a diluição foi realizada em 5% de acetona (0,5 mL), posteriormente essa solução foi diluída diretamente no alimento larval coletado dos favos (9,5 mL). A partir dessa solução estoque, foram realizadas sucessivas diluições em cascata até a obtenção das dietas finais para a concentração de campo e a concentração subletal a serem oferecidas as larvas.

Os bioensaios contaram com o grupo controle que recebeu apenas o alimento puro, controle solvente (alimento + 5% acetona) e os grupos expostos, contendo as concentrações do inseticida. Para o grupo controle solvente também foi realizada uma cascata de diluição, uma vez que a porcentagem de acetona obtida nas concentrações a serem utilizadas nos grupos não é exatamente 5%, mas sim uma

concentração menor devido as sucessivas diluições. Em vista disso, a partir da solução estoque de alimento + 5% de acetona, foram realizadas as diluições a fim de alcançar as mesmas concentrações obtidas nos grupos expostos, de modo que não alterasse a consistência e as propriedades do alimento larval.

Os bioensaios *in vitro* foram realizados com base nos métodos descritos por Rosa-Fontana *et al.* (2020) para abelhas nativas *S. postica*. Foram preparadas placas de acrílico com 100 cavidades, com altura e dimensão idênticas aos favos naturais de *S. postica*, a fim de reproduzir o desenvolvimento natural das abelhas que ocorre no campo. Os grupos experimentais foram realizados em triplicata, contabilizando 30 larvas por réplica (3x30), totalizando 90 larvas por placa para cada grupo experimental. Em vista disso, 360 larvas foram necessárias para realizar as transferências dos 4 grupos experimentais.

Durante os bioensaios de retirada de alimento e transferência de larvas, a sala foi mantida úmida para garantir a integridade dos favos, com o auxílio de dois ebulidores de água quente e um umidificador de ar, para impedir a desidratação e o ressecamento do alimento e das larvas. O alimento foi coletado diretamente das células de cria dos favos de cada colônia e homogeneizado para ser distribuído nos poços das placas com uma micropipeta automática de repetição. Cada poço recebeu o total de 25 μ L de alimento, valor equivalente ao consumo de alimento da espécie *S. postica* durante a fase larval, estabelecido por Dorigo *et al.* (2018).

Após a distribuição de todo o alimento larval nos poços das placas, as larvas de primeiro instar foram transferidas com o auxílio de uma agulha apícola, uma vez que a alimentação de larvas em abelhas sem ferrão ocorre de forma massiva, sendo o alimento depositado de uma única vez nas células de cria antes da oviposição (VELTHUIS, 1998).

Após a transferência das larvas, as placas de acrílico foram acondicionadas em placas de Petri de vidro, contendo água destilada no fundo. A água destilada foi utilizada para manter a umidade entre $95\pm 5\%$ nos primeiros dias de incubação. Essas placas foram acondicionadas em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) com ausência de luz, a 28°C.

Após 72h da transferência, a umidade interna das placas foi reduzida para 75% com uma solução de cloreto de potássio (KCl), que foi introduzida nas placas de Petri junto a água destilada. Após esse período foi realizada a substituição do KCl por cloreto de sódio (NaCl) em 120h do período de incubação. Essas condições

foram controladas com termo-higrômetro e mantidas até o final dos experimentos (ROSA-FONTANA *et al.*, 2020).

Após a emergência das abelhas entre o 35^o ao 38^o dia, as recém emergidas foram coletadas para a dissecação e processamento de histologia e morfologia, e para o acondicionamento em ultrafreezer -80°C para a realização das análises de modulação da atividade enzimática.

5.4.4. Processamento de histologia e morfologia

A dissecação do intestino e túbulos de Malpighi foi realizada após as abelhas emergirem das placas de cria (Figura 12). Foram dissecadas 15 abelhas por grupo experimental, com auxílio de estereomicroscópio. Os órgãos retirados foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas e armazenados em câmara fria (Figura 13).

Figura 12. Abelhas jovens emergindo das células de cria artificiais



Fonte: Autoria própria

Figura 13. Representação dos órgãos dissecados e fixados diretamente em paraformaldeído 4%.



Fonte: Autoria própria.

Após o período de dissecação e fixação, os órgãos foram transferidos para a solução tampão fosfato de sódio (pH 7.4 a 0,1 M) para manter o pH constante. Posteriormente, o material passou por uma desidratação lenta sob refrigeração em concentrações crescentes de álcool (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%) a 4°C, depois foi transferido para resina de embebição durante o período de 24 horas para inclusão em historesina (Leica) (SILVA-ZACARIN *et al.*, 2012).

Após a polimerização do material, os blocos de resina contendo os órgãos foram retirados da placa histomolde e fixados em cubos de madeira (1,5cm x 1,5cm). Posteriormente, os blocos foram submetidos a secções histológicas em planos de corte longitudinais, com espessura aproximada de 6µm em micrótomo RM2255 (Leica). As secções foram sobrepostas em lâminas histológicas e submetidas à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE).

5.4.5. Técnica de coloração pela Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983).

A Hematoxilina foi filtrada em papel filtro simples, para a retirada de impurezas presentes no corante. As lâminas foram mergulhadas em água destilada durante 1 minuto, submetidas à hematoxilina de Harris por 10 minutos, lavadas em água destilada por 5 minutos, e com água corrente por 10 minutos. Em seguida, as

lâminas foram coradas com eosina por 5 minutos e novamente lavadas com água corrente por 10 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram secas e montadas em meio de montagem DPX. Após a secagem e limpeza das lâminas, os cortes foram analisados e fotografados em fotomicroscópio de luz LEICA com auxílio do software LAS V4.4 para o registro das fotomicrografias em aumento de 40x e 100x.

5.4.6. Análise do material histológico

As análises das fotomicrografias foram realizadas no programa de processamento de imagens (ImageJ), o método aplicado foi baseado e adaptado de Grella et. al (2019). Para cada alteração observada foi utilizado um valor de escore que representa a gravidade dos danos nos órgãos. Para tanto, foram selecionadas 10 fotomicrografias para cada órgão de estudo (intestino e túbulos), totalizando 60 fotomicrografias entre os grupos experimentais.

Para perda de material citoplasmático, borda em escova e inchaço celular foram realizadas 3 medições em diferentes regiões da imagem com aumento final de 400x, em cada intestino médio e túbulos de Malpighi, posteriormente a média por órgão foi calculada. Já as alterações como eliminação de células, picnose e quantidade de ninhos de células regenerativas foram analisadas por meio da contagem das células afetadas com relação ao número total de células e ninhos na imagem inteira, os resultados foram obtidos em porcentagem. As análises de secreção apócrina e esferocristas foram realizadas utilizando contraste de imagem, os resultados foram obtidos pela porcentagem da área mais escura em relação a área total da imagem.

Para determinar as alterações no intestino médio e túbulos de Malpighi, foi levado em consideração o índice de importância da lesão nos órgãos (Tabela 2), com relação a frequência de ocorrência desses danos. Com base nesses dados foi multiplicado o valor do escore pela frequência de ocorrência das alterações (Grella et al., 2019).

Diante desse contexto, as alterações foram classificadas em três níveis, com base na relevância dos danos patológicos: o grau 1 representa um dano menor quando exposto a um agente tóxico, esse caso é facilmente reversível; o grau 2 representa uma lesão moderada, possivelmente reversível; já o grau 3 representa uma lesão mais severa, considerada grave e irreversível. Já os valores de

frequência são 0, 2, 4 e 6, com 0 representando a ausência de uma alteração e 6 representando uma ocorrência de alta frequência, uma vez que as alterações morfológicas podem ocorrer em diferentes frequências dependendo da abelha e do agrotóxico utilizado.

Tabela 2: Alterações e pontuações atribuídas a cada um dos órgãos analisados

| Alterações morfológicas no intestino médio e túbulos de Malpighi | Score |
|---|--------------|
| Secreção apócrina | 1 |
| Esferocristais | 1 |
| Perda de material citoplasmático | 1 |
| Perda de borda em escova | 2 |
| Eliminação de células para o lúmen | 2 |
| Inchaço celular / redução do lúmen | 2 |
| Perda de ninhos de células regenerativas | 3 |
| Células com picnose / condensação cromatínica | 3 |

Fonte: Adaptado de Grella *et al.* (2019). Todas as alterações são analisadas em ambos os órgãos, com exceção de inchaço celular / redução do lúmen, avaliado apenas em túbulos de Malpighi.

5.4.7. Processamento dos testes de modulação da atividade enzimática

Após a emergência das abelhas nos bioensaios de criação *in vitro*, 25 indivíduos de cada grupo experimental (controle, 0,1 ng i.a./ μ L e 1 ng i.a./ μ L) foram coletados e armazenados em ultrafreezer -80°C, para a preservação e viabilidade da região de interesse. No momento do experimento, abdomens de recém-emergidas foram separados do corpo por meio de um corte com tesoura de dissecação, posteriormente, os abdomens foram processados para a extração das enzimas.

A atividade de cada amostra foi determinada a partir de 3 poços (triplicata), sendo que para cada condição foram analisadas 5 amostras contendo 5 abdomens cada uma (n= 25 por grupo), ou seja, cada microtubo contendo 5 abdomens foi aplicado 3 vezes. Para isso, as amostras foram maceradas e centrifugadas em solução de extração, cuja quantidade foi previamente calculada de acordo com o peso de cada amostra (10% p/v de extrato). A solução de extração foi composta de

10 mM NaCl, 1% (w/v), Triton X-100 e 40 mM fosfato de sódio pH 7.4, como também uma mistura dos inibidores de proteases. Os extratos dos tecidos foram centrifugados durante 20 min a 12.6000rpm em uma velocidade de 15.000xg, resultando em sobrenadantes que foram coletados e utilizados para as análises, toda a extração foi realizada a 4°C.

A análise da atividade das enzimas foi realizada em leitora de placas (espectrofotômetro), a 24° C. O protocolo utilizado foi baseado em Badiou-Bénéteau *et al.* (2012) e Pal *et al.* (2022), a atividade da CaEs-3 foi conduzida a partir de 5 µL de extrato de tecido com 1.100 µL de BW284C51 diluído em água destilada 1/10, 1.100 µL de p-nitrofenil acetato diluído em água destilada 1/10, e 2.200 µL de tampão fosfato 5X pH 7. A atividade foi avaliada a 410 nm por 10 minutos. A atividade da GST foi avaliada por meio de 10 µL de extrato com 1.100 µL de GSH 10X, 110 µL de EDTA 100X, 110 µL de CDNB 100X e 2.200 µL de tampão fosfato 5X pH 7,4, a atividade foi avaliada a 340nm por 10 minutos. A atividade da G6PD foi avaliada a partir de 10 µL de extrato com 2.200 de tampão trizma base 5X, 1.100 µL de G6P 10X, 1.100 µL de MgCl₂ 10X e 1.100 µL de NADP 10X. A atividade foi avaliada a 340nm por 10 minutos. Por último, a atividade da enzima GPx foi conduzida por meio de 10 µL de extrato de tecido com 1.100 µL de tampão fosfato 10X pH 7,4, 1.100 µL de EDTA 10X, 1.100 µL de NADPH 10X, 110 µL de glutathione redutase 100X. A atividade foi avaliada a 340nm por 10 minutos.

5.4.8. Análises estatísticas

As alterações morfológicas foram analisadas com base nos scores e nas frequências descritas na literatura. Os resultados obtidos abrangem uma análise semiquantitativa das alterações encontradas nos órgãos, incluindo a extensão e relevância patológica dos danos causados pela clotianidina no intestino médio e túbulos de malpighi das abelhas.

Para tanto, foram realizadas análises a partir da comparação entre o grupo controle e os grupos expostos a clotianidina. Os dados obtidos não apresentaram distribuição normal, uma vez que os scores são atribuições de valores pré-determinados e considerados não-paramétricos (TRIOLA, 2008). Em vista disso, os resultados foram submetidos a análise estatística comparativa, com a utilização do teste de Friedman, utilizando o pacote Agricolae no software estatístico RStudio versão 4.2.0 (MENDIBURU, 2019; R CORE TEAM, 2022).

Para as análises enzimáticas, os dados originais ou transformados pelo método de Box-Cox (1964) não atenderam aos pressupostos das análises de variância (ANOVA). Em vista disso, foi utilizado o teste de comparação das medianas. O procedimento utilizado consiste em um teste não paramétrico para múltiplas amostras independentes. O teste da mediana, é disponibilizado pela função `median.test` do pacote “*agricolae*” do software R. Os grupos expostos foram individualmente comparados com o grupo controle e diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ (MENDIBURU *et al.*, 2019; R CORE TEAM, 2022).

5.5. RESULTADOS

5.5.1. Efeitos da clotianidina na morfologia do intestino médio e túbulos de Malpighi de recém-emergidas

Os grupos controle e controle solvente não diferiram entre si durante os bioensaios de criação larval realizados neste capítulo e no capítulo 1. Em vista disso, apenas um controle foi analisado morfológicamente e os resultados das alterações apresentaram características consideradas normais no intestino médio e túbulos de Malpighi.

As médias dos índices de lesões dos diferentes parâmetros analisados são mostrados nas tabelas 3 e 4. Para os grupos expostos a 0,1 ng i.a./ μ L e 1 ng i.a./ μ L de clotianidina, houve diferença estatística entre as alterações em comparação com o grupo controle, tanto no intestino médio quanto nos túbulos de Malpighi.

Alterações como perda de material citoplasmático; perda de borda em escova; eliminação de células para o lúmen; perda de ninhos de células regenerativas; inchaço celular e picnose apresentaram médias significativas. Com exceção de secreção apócrina e esferocristais, essas duas últimas alterações não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais para os índices de lesão.

Os resultados demonstraram um aumento significativo das alterações morfológicas encontradas no intestino médio e túbulos de Malpighi. Quanto maior a concentração administrada, maiores foram as médias dos índices de lesões encontradas. O grupo exposto a concentração de campo (1 ng/ μ L) apresentou as maiores médias para alterações consideradas irreversíveis nos órgãos, como por

exemplo, perda de ninhos de células regenerativas e picnose/condensação cromatínica.

Tabela 3. Valores da média e erro padrão das alterações encontradas no intestino médio de recém emergidas expostas a clotianidina.

| Grupos | Sa | Esfcr | Pmc | Pbe | Ecl | Pncr | Pic |
|-----------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Controle | 2 ± 0 a | 2 ± 0 a | 0 ± 0 a | 5.6 ± 0.36 a | 2 ± 0 a | 6 ± 0 a | 6 ± 0 a |
| 0.1 ng/μL | 2 ± 0 a | 2 ± 0 a | 5.3 ± 0.35 b | 10.0 ± 0.37 b | 3.4 ± 0.17 b | 10.8 ± 0.44 b | 13.2 ± 0.97 b |
| 1 ng/μL | 2 ± 0 a | 2 ± 0 a | 12 ± 0 c | 12 ± 0 c | 5.4 ± 0.17 c | 17.4 ± 0.33 c | 18 ± 0 c |

Alterações no grupo controle e grupos expostos a clotianidina (0.1 ng/μL e 1 ng/μL): (Sa) secreção apócrina; (Esfcr) esferocristais; (Pmc) perda de material citoplasmático; (Pbe) perda de borda em escova; (Ecl) eliminação de células para o lúmen; (Pncr) perda de ninhos de células regenerativas e (Pic) picnose. A ocorrência de letras distintas entre os grupos indica significância estatística ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores da média e erro padrão das alterações encontradas nos túbulos de Malpighi de recém emergidas expostas a clotianidina.

| Grupos | Sa | Esfcr | Pmc | Pbe | Ecl | InchCel | Pic |
|-----------|-------------------|-------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------|
| Controle | 2 ± 0 a | 2 ± 0 a | 0 ± 0 a | 4.8 ± 0.29 a | 2.2 ± 0.11 a | 0 ± 0 a | 6 ± 0 a |
| 0.1 ng/μL | 2 ± 0 a | 2 ± 0 a | 4.26 ± 0.18 b | 7.6 ± 0.22 b | 5.8 ± 0.11 b | 4 ± 0 b | 16.8 ± 0.44 b |
| 1 ng/μL | 2 ± 0 a | 2 ± 0 a | 10.8 ± 0.34 c | 12 ± 0 c | 6 ± 0 b | 12 ± 0 c | 18 ± 0 c |

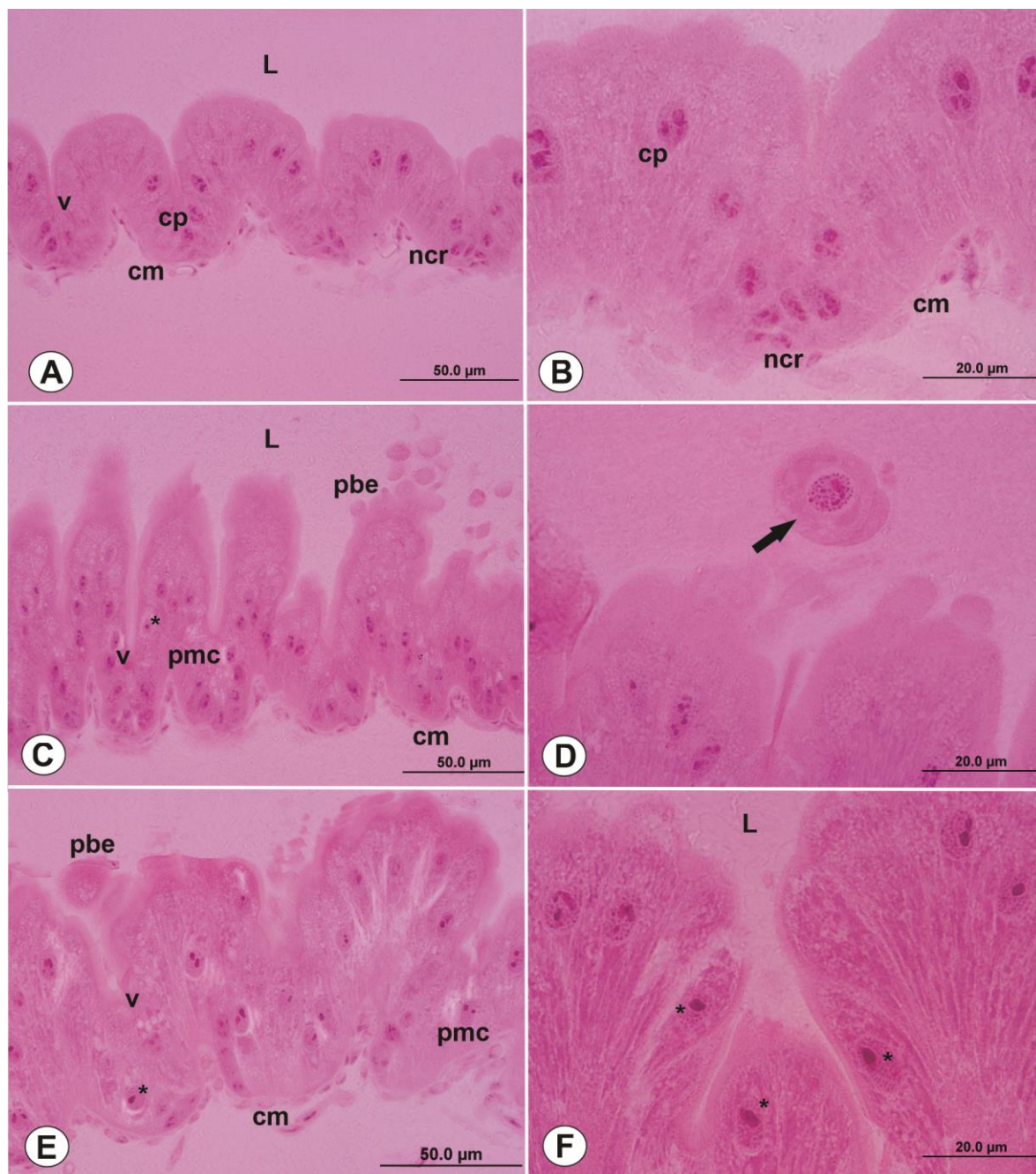
Alterações no grupo controle e grupos expostos a clotianidina (0.1 ng/μL e 1 ng/μL): (Sa) secreção apócrina; (Esfcr) esferocristais; (Pmc) perda de material citoplasmático; (Pbe) perda de borda em escova; (Ecl) eliminação de células para o lúmen; (InchCel) inchaço celular e (Pic) picnose. A ocorrência de letras distintas entre os grupos indica significância estatística ($p < 0,05$).

As análises morfológicas do intestino médio de recém emergidas *S. postica* apresentaram padrões morfológicos considerados normais das vilosidades intestinais no grupo controle (Fig. 14A–B), com capa de fibras musculares viscerais, constituídas por um epitélio simples de células prismáticas e borda em escova claramente evidentes na porção apical das células, com ninhos de células regenerativos na base do epitélio circundados por células principais.

No entanto, os intestinos das recém emergidas dos grupos expostos 0.1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L apresentaram alterações nos padrões histológicos encontrados no grupo controle. As vilosidades dos grupos expostos se apresentaram irregulares (Fig. 14C-E) com eliminação de células para o lúmen (Fig. 14D); perda da borda em escova (Fig. 14C-E); células principais com núcleos picnóticos e condensação da cromatina (Fig. 14F) e; presença de perda de material citoplasmático/vacuolização em volta das células principais e por todo o epitélio (Fig. 14C-D).

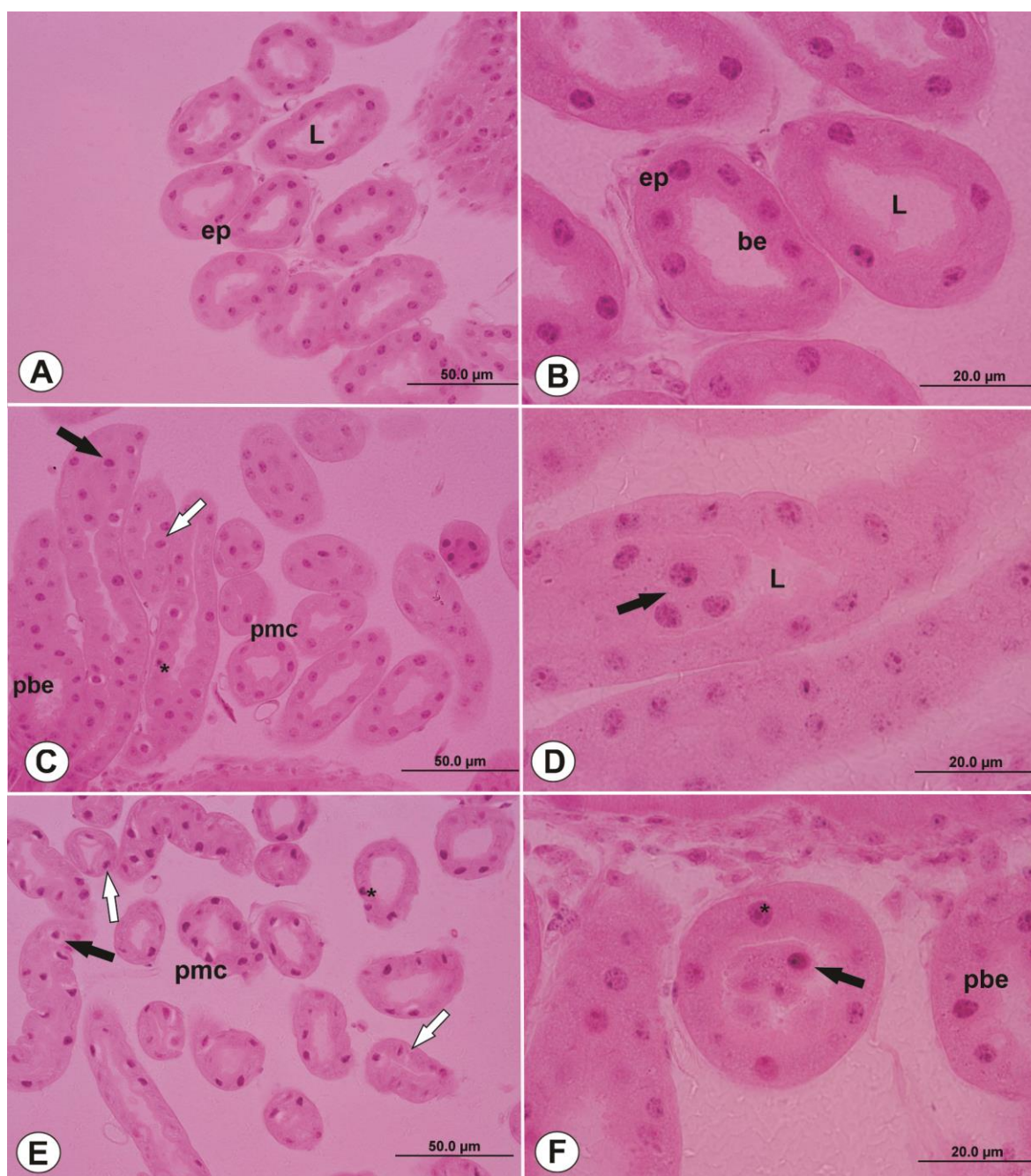
Já as análises nos túbulos de Malpighi do controle apresentaram células epiteliais normais, túbulos abertos com lúmen bem evidente e borda em escova bem delimitada (Fig. 15A-B). Os grupos expostos a 0.1 ng/ μ L e 1 ng/ μ L de clotianidina, apresentaram um aumento na eliminação de células para o lúmen (Fig. 15D-F); inchaço celular com redução do lúmen (Fig. 15C-E); perda de material citoplasmático (Fig. 15C-E) e células com núcleo picnótico/condensação da cromatina (Fig. 15C-E-F).

Figura 14. Fotomicrografias das estruturas de tecido e alterações no intestino médio de *S. postica*.



Fonte: Autoria própria. Coloração por hematoxilina e eosina. (A e B) grupo controle; (C e D) grupo exposto a concentração subletal 0.1 ng/μL de clotianidina; e (E e F) grupo exposto a concentração de campo de 1 ng/μL. (L) lúmen; (cp) células principais; (ncr) ninho de células regenerativas; (pbe) perda de borda em escova; (pmc) perda de material citoplasmático; (*) picnose; (v) vilosidade; (cm) capa muscular protetora; e (seta preta) células eliminadas para o lúmen. Aumento de 40x e 100x, respectivamente.

Figura 15. Fotomicrografias das estruturas de tecido e alterações nos túbulos de Malpighi de *S. postica*.



Fonte: Autoria própria. Coloração por hematoxilina e eosina. (A e B) grupo controle; (C e D) grupo exposto a concentração subletal 0.1 ng/μL de clotianidina; e (E e F) grupo exposto a concentração de campo de 1 ng/μL. (L) lúmen; (ep) células epiteliais; (be) borda em escova; (pbe) perda de borda em escova; (pmc) perda de material citoplasmático; (*) picnose; (seta preta) células eliminadas para o lúmen; e (seta branca) inchaço celular. Aumento de 40x e 100x, respectivamente.

5.5.2. Efeitos da clotianidina sobre a modulação da atividade enzimática de recém emergidas

As análises dos efeitos da exposição de larvas de *S. postica* a clotianidina foram realizadas após a emergência das abelhas. Os grupos controle e controle solvente não diferiram entre si durante os bioensaios de criação larval realizados neste capítulo e no capítulo 1, em vista disso, apenas um controle foi analisado.

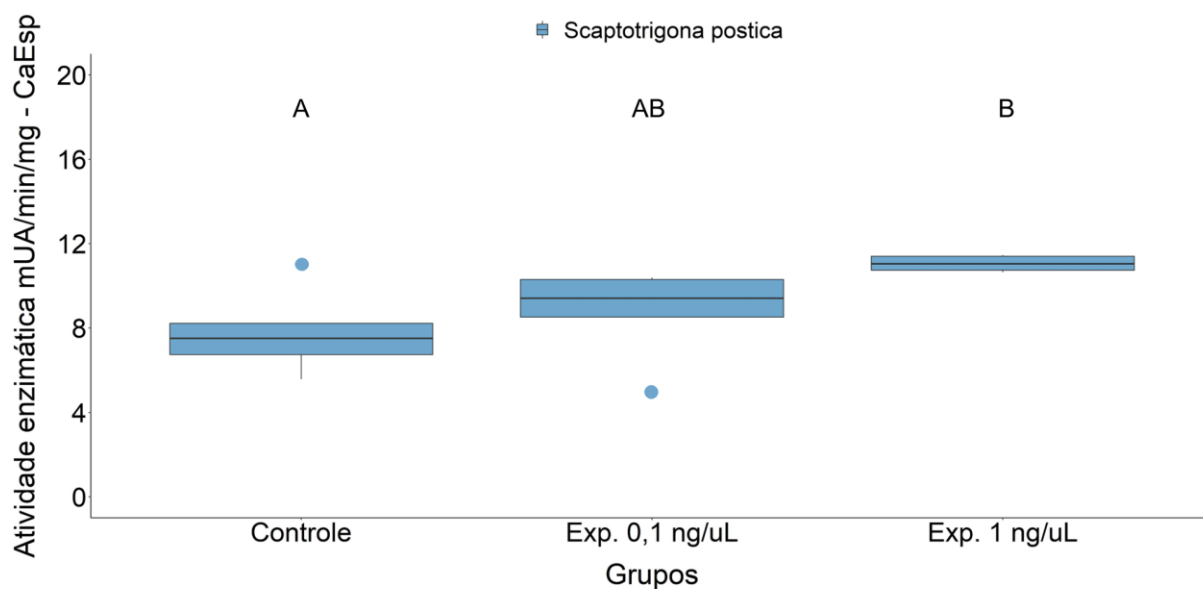
A clotianidina teve efeito sobre a atividade da CaEs-3 do grupo exposto a concentração de campo de 1 ng/μL, em comparação com o respectivo grupo controle, conforme a figura 16. As abelhas expostas a 1 ng/μL durante o período larval apresentaram um aumento na atividade da CaEs-3 correspondendo a $11,05 \pm 0,37$ mUA/min/mg (valor do controle $7,08 \pm 2,03$ mUA/min/mg) ($p < 0,05$). A concentração subletal de 0,1 ng/μL não apresentou significância estatística quando comparada ao grupo controle e a concentração de campo (1 ng/μL).

A atividade da GST apresentou aumento no grupo exposto a concentração de campo (valores de $15,93 \pm 0,35$ mUA/min/mg) quando comparada ao grupo controle ($13,23 \pm 1,8$ mUA/min/mg). Já a concentração subletal de 0,1 ng/μL não apresentou diferença estatística entre os grupos, como é possível observar na figura 17.

Com relação a modulação da atividade da G6PD, houve significância estatística entre a concentração de campo ($6,35 \pm 0,37$ mUA/min/mg) e o grupo controle ($3,05 \pm 1,9$ mUA/min/mg), a concentração subletal não apresentou diferença entre os grupos, conforme é apresentado na figura 18. No que se refere a atividade da enzima GPx, não foi observada significância estatística entre nenhum dos grupos (figura 19).

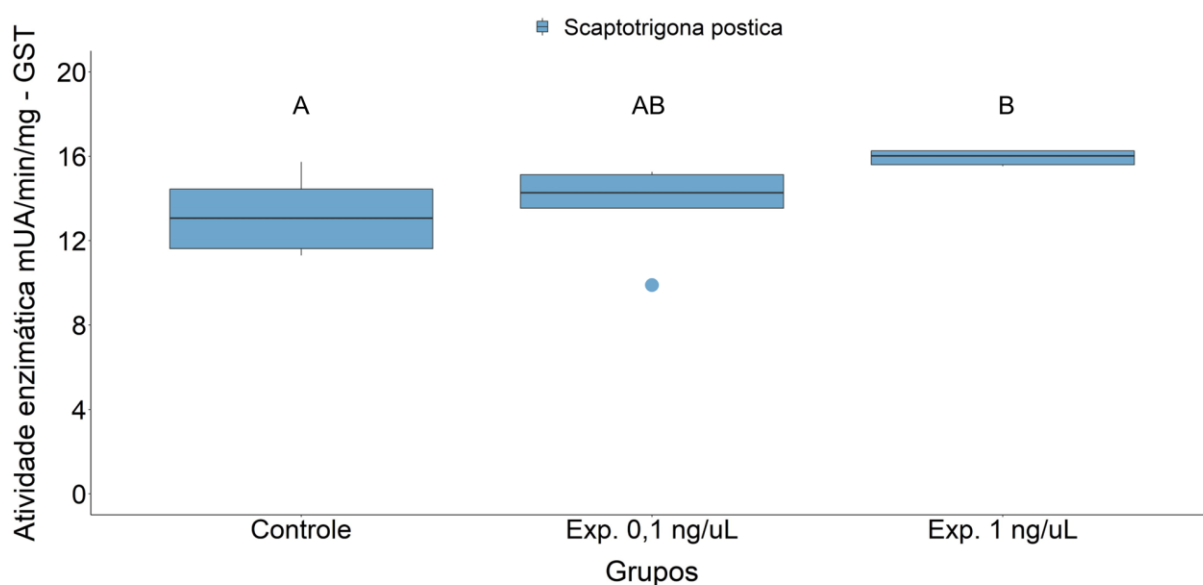
Adicionalmente, em uma análise global dos resultados dos testes enzimáticos, os níveis de CaEs-3, GST e G6PD no grupos expostos a concentração mais alta deste estudo (1 ng/μL), apresentaram aumentos na atividade com relação ao grupo controle. A concentração subletal não apresentou diferença estatística em nenhum dos casos quando comparada aos grupos controle e concentração de campo.

Figura 16. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da carboxilesterase 3 em abelhas *S. postica*.



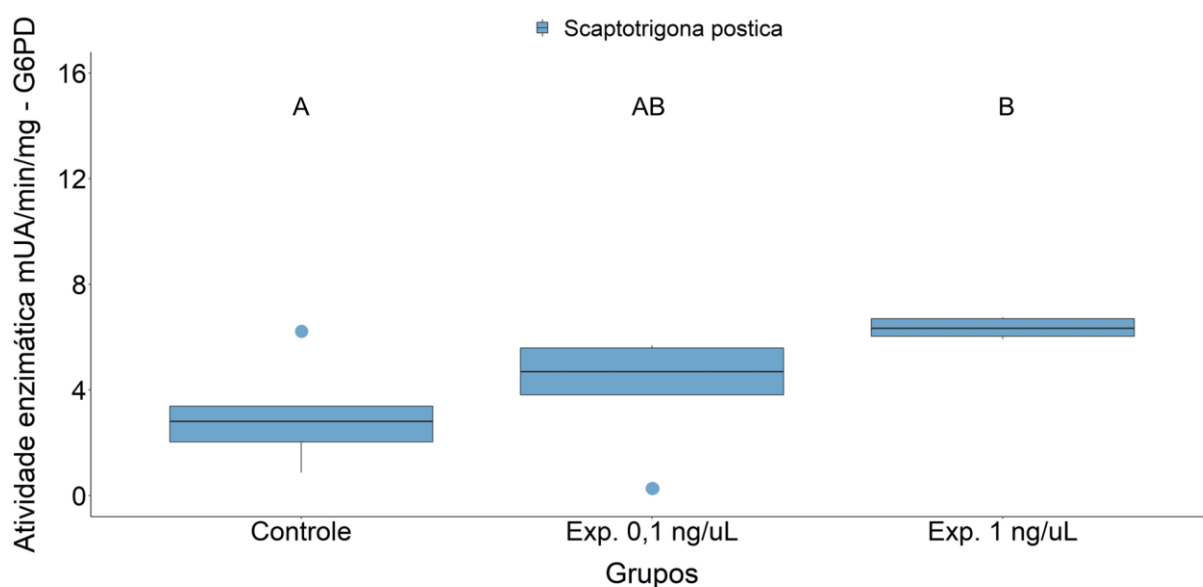
As comparações foram feitas entre os grupos, médias seguidas pela ocorrência de letras distintas indicam significância estatística ($p < 0,05$). (Outliers estão identificados por círculos).

Figura 17. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glutaciona-S-transferase em abelhas *S. postica*.



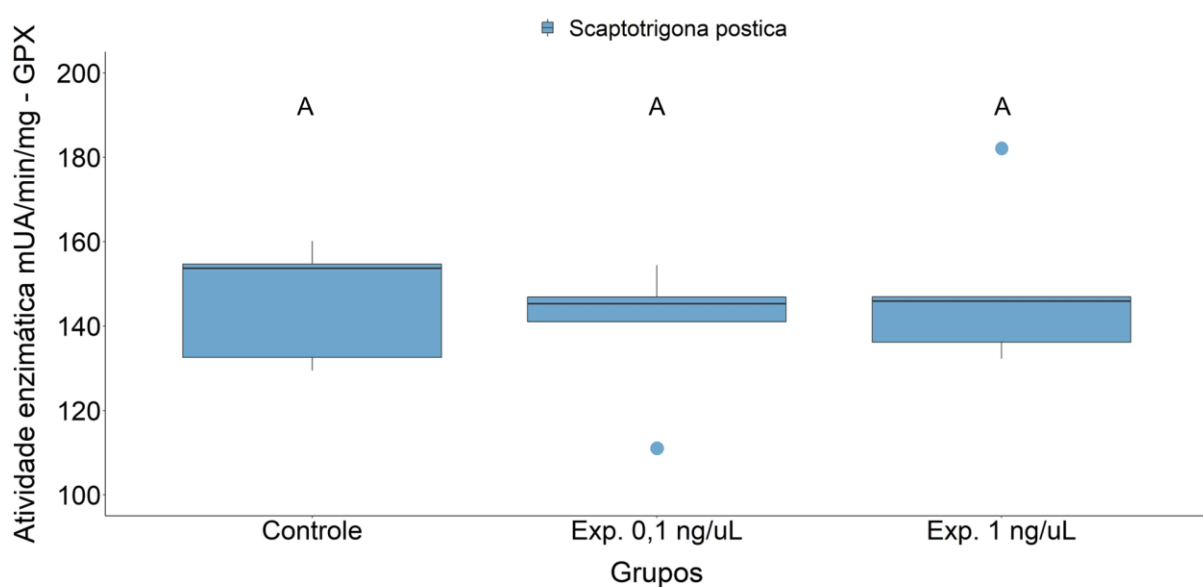
As comparações foram feitas entre os grupos, médias seguidas pela ocorrência de letras distintas indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Figura 18. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase em abelhas *S. postica*.



As comparações foram feitas entre os grupos, médias seguidas pela ocorrência de letras distintas indicam significância estatística ($p < 0,05$).

Figura 19. Boxplot demonstrando a atividade enzimática da glutathione peroxidase em abelhas *S. postica*.



As comparações foram feitas entre os grupos, médias seguidas pela mesma letra não indicam significância estatística ($p = 0,05$).

5.6. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi demonstrado que a abelha nativa sem ferrão *S. postica* foi sensível a todos os parâmetros analisados após a exposição à clotianidina, o que é alarmante, uma vez que as concentrações administradas neste estudo são encontradas no campo, como foi estimado pelo BeeRex e destacado em outros estudos (HERNANDO *et al.*, 2018; SCHNEIDER *et al.*, 2012; ALKASSAB; KIRCHNER, 2018).

Com relação as análises morfológicas, existe uma estreita relação entre a diminuição da sobrevivência nos grupos expostos à clotianidina com as alterações histopatológicas observadas no intestino médio das abelhas. O intestino médio desempenha funções vitais para manter o nível individual da homeostase, quaisquer alterações que comprometam a integridade desse órgão pode levar a morte (SNODGRASS, 1956; TERRA; FERREIRA, 2012).

Diante desse contexto, o índice de lesão é uma importante ferramenta de avaliação de alterações a nível celular, com aplicabilidade em diferentes órgãos. Com essa ferramenta é possível monitorar alterações histopatológicas causadas por xenobióticos. Esse índice foi proposto pela primeira vez para organismos aquáticos (Bernet *et al.*, 1999) e adaptado para abelhas em outros estudos (GRELLA *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2019; TADEI *et al.*, 2020).

As médias obtidas dos índices de lesão no intestino médio e túbulos de Malpighi demonstraram que a concentração subletal e a concentração de campo de clotianidina resultaram em alterações morfológicas severas e, na maioria dos casos, irreversíveis. Mesmo a menor concentração administrada no alimento larval foi capaz de induzir dano tecidual no intestino e túbulos de Malpighi das abelhas do presente estudo.

Essas alterações morfológicas observadas no intestino médio e túbulos de Malpighi são indicativos da citotoxicidade da clotianidina. As células principais envolvidas nos processos de morte celular apresentam núcleos centrais compactos com cromatina condensada e um halo claro ao seu redor (CAVALCANTE; CRUZ-LANDIM, 2004), essas características foram observadas nas células dos grupos expostos à clotianidina no presente estudo. Outra alteração característica que indica morte celular em insetos, é a perda de material citoplasmático ao entorno das células com compactação da cromatina (SILVA-ZACARIN, 2007).

Ficou evidente o aumento de eliminação de células para o lúmen em ambos os grupos expostos. Após a eliminação das células desgastadas, ocorre a substituição destas para auxiliar no processo de recuperação do intestino (CATAE *et al.*, 2014). Essas células são denominadas digestivas ou enterócitos e desempenham um importante papel na produção de enzimas digestivas. No entanto, são as mais afetadas por xenobióticos por possuírem maior contato com as substâncias que são ingeridas (CRUZ-LANDIM, 1985; CAETANO *et al.*, 1994; SERRÃO, 1995).

Outros estudos também observaram um aumento na eliminação de células em abelhas expostas a agrotóxicos via oral (SOARES, 2012; CARNEIRO, 2018). Oliveira e colaboradores (2013) evidenciaram esse aumento em abelhas expostas a concentrações subletais de tiametoxam. Além disso, é importante destacar que as células principais possuem um tempo de vida limitado, em vista disso, são facilmente eliminadas em situações em que estão presentes substâncias tóxicas ou patológicas. A substituição dessas células é realizada a partir da diferenciação de células regenerativas (CRUZ-LANDIM, 1999; CRUZ-LANDIM, 2009).

Por esse motivo, a perda de ninhos de células regenerativas pode provocar danos irreparáveis ao intestino. Essa alteração foi classificada com score 3, uma vez que se trata de um dano mais severo e irreversível ao órgão (GRELLA *et al.*, 2019). No presente estudo a perda de ninhos de células regenerativas observada nos intestinos de *S. postica* expostas à clotianidina, pode ter prejudicado severamente o sistema de substituição de células principais no organismo das abelhas recém emergidas.

Outra alteração observada ao comparar os grupos expostos com o controle foi a perda da borda em escova, em ambos os órgãos de estudo. Para Grella *et al.* (2019), a perda da borda em escova pode provocar inúmeros problemas no funcionamento dos órgãos, como danos às células epiteliais. Uma vez que essa borda tem o papel de proteger o epitélio contra colisões diretas de alimentos ingeridos. A pontuação atribuída à perda da borda em escova foi 2, pois o dano dificilmente é reversível.

Em relação aos túbulos de Malpighi das abelhas no grupo controle, a análise morfológica indicou ausência de alterações histopatológicas, as células excretoras apresentaram tanto a borda em escova quanto o lúmen bem evidente, o que indica a manutenção da funcionalidade dos túbulos no processo de excreção (NOCELLI *et*

al., 2016). Em contrapartida, os túbulos dos grupos expostos a 0.1 ng/μL e 1 ng/μL de clotianidina apresentaram inchaço celular com redução do lúmen, o que indica que o órgão não estava desempenhando suas funções corretamente.

Rossi e colaboradores (2013) observaram células com núcleos picnóticos, inchaço celular com redução do lúmen, presença de vacuolização citoplasmática e aumento na eliminação das células epiteliais nos túbulos de Malpighi de abelhas *A. mellifera* tratadas com imidacloprido. As mesmas alterações foram observadas em nosso estudo.

Por outro lado, a ausência de secreção apócrina e esferocristais no intestino médio e túbulos de Malpighi em todos os grupos experimentais, demonstrou ser um padrão. Tal característica poder ser explicada pelo tempo de vida das abelhas recém emergidas, uma vez que esse pode ser um fator na redução dessas alterações. Como por exemplo, a redução do esferocristal, que pode ocorrer com a idade do inseto (RYERSE, 1979).

Miotelo *et al.* (2022) investigaram a toxicidade do neonicotinoide tiametoxam em órgãos de abelhas sem ferrão. Os autores observaram que os danos celulares no intestino médio e túbulos de Malpighi refletiram principalmente em forma de núcleos com cromatina condensada, indicando morte celular. No referido trabalho, as alterações mais frequentes nos túbulos de Malpighi foram perda de microvilosidades, desorganização do labirinto basal e perda citoplasmática. Essas características podem estar relacionadas ao aumento dos mecanismos celulares de excreção, provavelmente pelo elevado número de moléculas tóxicas de tiametoxam que precisavam ser eliminadas.

Friol *et al.* (2017) avaliaram a exposição larval do neonicotinoide tiametoxam em abelhas *A. mellifera* e evidenciaram que a presença de danos nos ninhos de células regenerativas provocaram alterações estruturais posteriores nas abelhas adultas, especialmente em células digestivas do intestino médio que se diferenciaram durante a metamorfose. Nas células dos túbulos de Malpighi observou-se labirinto basal e microvilosidades desorganizadas. Os autores sugerem que tais resultados indicam comprometimento da função celular das células do intestino médio e dos túbulos de Malpighi.

Os resultados das alterações morfológicas demonstraram que a clotianidina apresentou citotoxicidade no intestino médio e túbulos de Malpighi das abelhas recém emergidas expostas durante a fase larval. Em condições de campo, as

abelhas estão expostas a uma ampla diversidade de agrotóxicos (GOULSON *et al.*, 2015), e investigações desta natureza, a nível celular, são essenciais para compreender como estressores podem impactar negativamente a saúde desses polinizadores.

Já com relação aos resultados das análises de modulação de biomarcadores enzimáticos, foi possível constatar que, após a exposição a clotianidina, abelhas expostas a concentração de campo durante a fase larval, apresentaram um aumento significativo na atividade da enzima CaEs-3 em comparação ao grupo controle. Isso se deve ao fato de que um dos principais mecanismos utilizados pelos insetos para escapar dos efeitos adversos de xenobióticos, como os neonicotinóides, é a resistência metabólica. E algumas das principais superfamílias de enzimas responsáveis pelo metabolismo ou desintoxicação de toxinas são as carboxilesterases (CaEs) e as glutatiónas transferases (GSTs) (LI *et al.*, 2007).

Badawy e colaboradores (2015), avaliaram a toxicidade e alterações bioquímicas em abelhas *Apis mellifera* tratadas com quatro inseticidas – acetamiprido, dinotefuram, pimetozina e piridaliil. Abelhas forrageiras foram expostas a diferentes concentrações dos inseticidas via alimentação oral, os dados mostraram que os inseticidas testados variaram em sua influência nas atividades de carboxilesterase e GST, que foram altamente correlacionadas com sua toxicidade contra *A. mellifera*. A análise bioquímica de carboxilesterase e GST mostrou que essas enzimas desintoxicaram doses baixas de acetamiprido, pimetozina e piridaliil.

O aumento da atividade da carboxilesterase pode refletir no processo de biotransformação do inseticida no organismo, uma vez que a CaEs é uma enzima de desintoxicação de fase I (SOGORB; VILANOVA, 2002). No entanto, os mecanismos de desintoxicação de abelhas nativas sem ferrão expostas a neonicotinóides são pouco caracterizados, visto que uma grande parcela dos estudos disponíveis na literatura foram produzidos para *A. mellifera*.

Tavares e colaboradores (2017), investigaram os efeitos do tiametoxam em larvas, pupas e abelhas emergidas de *A. mellifera* após exposição em estágios larvais com diferentes concentrações do inseticida. Os autores constataram que as atividades da GST e da CaEs-3 aumentaram nos estágios de pupa. Essas descobertas são semelhantes aos resultados encontrados para recém-emergidas em nosso estudo, uma vez que a clotianidina também induziu a atividade dessas enzimas. Contudo, a concentração subletal de 0.1 ng/μL não apresentou diferenças

significativas, apenas a concentração mais alta (1 ng/ μ L). Com isso podemos inferir que a ativação ou inibição do sistema enzimático pode estar relacionada as concentrações administradas de clotianidina.

Os inseticidas têm se mostrado indutores de várias enzimas desintoxicantes, incluindo glutathione S-transferase e carboxilesterase em insetos (HAYAOKA; DAUTERMAN, 1982; WONGKOBROT; DAHLMAN, 1976). No presente estudo ficou evidente o aumento da atividade da GST no grupo exposto a concentração de campo de clotianidina, quando comparado ao grupo controle. Outros autores também verificaram a atividade de enzimas de desintoxicação, e no caso da glutathione S-transferase, medida em larvas, pupas e adultos de abelhas (*Apis mellifera ligustica* Spinola), o tratamento com flumetrina induziu o aumento da atividade de GST nos ínstares larvais, pupas e abelhas enfermeiras em comparação com o grupo controle (NIELSEN *et al.*, 2000).

Decio *et al.* (2021) investigaram os danos causados por uma concentração subletal de tiametoxam (0,0227 ng/ μ L) na cabeça e intestino médio de *Apis mellifera* africanizada, analisando os biomarcadores enzimáticos, estresse oxidativo e ocorrência de peroxidação lipídica. No referido trabalho o inseticida aumentou a atividade da glutathione-S-transferase (GST), enquanto a atividade da carboxilesterase (CaEs-3) diminuiu. Tais descobertas reforçam a hipótese de que a inibição ou ativação da atividade enzimática pode depender das concentrações administradas de determinado inseticida, uma vez que a GST apresentou diferenças significativas apenas na concentração mais alta deste estudo.

Além dos resultados obtidos em relação as enzimas de desintoxicação, vale ressaltar que também houve um aumento na modulação da atividade de enzimas antioxidantes. No presente estudo foi possível observar esse aumento sobre a atividade tecidual da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), considerada uma enzima metabólica e antioxidante, a G6PD está totalmente relacionada a funções fisiológicas muito importantes envolvendo o sistema imunológico (KAIRO *et al.*, 2017). Em vista disso, o aumento na sua atividade pode estar relacionado a necessidade de prevenir o estresse oxidativo em decorrência da exposição a xenobióticos, neste caso, a clotianidina.

Renzi *et al.* (2016) observaram em seu estudo que o efeito do fipronil, mesmo em baixas concentrações, foi confirmado pelo aumento significativo da G6PD. Esse aumento pode ser um sinal da resposta celular às condições oxidativas (KLETZIEN

et al.,1994; VERMA *et al.*, 2007). Tais achados são semelhantes ao que foi observado em nosso estudo, uma vez que o grupo exposto a concentração de campo (1 ng/ μ L) apresentou um aumento na modulação da atividade da G6PD, quando comparado ao grupo controle.

Além de seu importante papel como enzima antioxidante, a G6PD também participa das vias de metabolização de carboidratos. Para Kunieda *et al.* (2006), essa enzima pode ter funções particularmente interessantes na abelha *Apis mellifera*, visto que esse inseto possui uma dieta rica em carboidratos e a nutrição desempenha papéis importantes na determinação de castas e plasticidade comportamental mediada socialmente. Diante desse contexto, vale salientar que esses dados reforçam a atual necessidade de maiores investigações para abelhas sem ferrão, uma vez que há uma grande escassez de informações sobre esses biomarcadores enzimáticos e suas vias de metabolização de substâncias a nível bioquímico em espécies nativas.

Adicionalmente, não foram observadas diferenças significativas na atividade tecidual da glutathione peroxidase (GPx) neste estudo. Em contrapartida, foi demonstrado pela primeira vez por Abdelkader *et al.* (2019) que a clotianidina provoca aumentos significativos nos níveis de GPx em *A. mellifera*. Comparando os dados da literatura com os resultados obtidos em nosso estudo, inferimos que as abelhas recém-emergidas *S. postica* podem apresentar baixa atividade de enzimas antioxidantes, como a GPx. Este argumento é semelhante ao que foi proposto por Smirle e Winston (1987), que descobriram que as abelhas recém-emergidas têm baixa atividade específica de enzimas de desintoxicação, o que as torna particularmente vulneráveis a qualquer tipo de tóxico ambiental. Com base nessas informações, presume-se que a atividade de enzimas antioxidantes também pode ser baixa em abelhas recém emergidas.

Os resultados demonstraram que a clotianidina modulou diferencialmente os biomarcadores de exposição e de estresse oxidativo. Contudo, maiores investigações são necessárias para compreender com exatidão quais são os mecanismos que envolvem as respostas aqui observadas.

Além disso, este conjunto de biomarcadores pode ser uma ferramenta promissora para avaliar a saúde das abelhas e caracterizar exposições a neonicotinoides. No geral, esses resultados são valiosos não apenas para avaliar a

toxicidade de inseticidas em polinizadores, mas também para destacar a validade da atividade de enzimas como indicadores de exposição a agrotóxicos.

Em suma, fica clara a relevância deste trabalho e a necessidade de estudos futuros para confirmar como os neonicotinoides, especialmente a clotianidina, afetam os órgãos de metabolização de substâncias, tanto morfológicamente (a nível celular), como também por meio da modulação de enzimas biomarcadoras (a nível bioquímico e molecular).

5.7. CONCLUSÃO

Os efeitos adversos da clotianidina podem comprometer potencialmente a saúde de abelhas *S. postica*. Tais resultados sugerem comprometimento das funções celulares vitais que podem prejudicar o funcionamento do intestino médio e dos túbulos de Malpighi e, conseqüentemente, comprometer a longevidade das abelhas e de toda a colônia. Além disso, a clotianidina modulou diferencialmente os biomarcadores de exposição e de estresse oxidativo, induzindo a atividade das enzimas testadas, com exceção da GPx. Essas recentes descobertas auxiliarão estudos futuros que visam avaliar a saúde das abelhas sem ferrão, caracterizar a exposição a neonicotinoides e avaliar outros estressores ambientais, a nível individual e de colônia.

5.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALKASSAB, A.T.; KIRCHNER, W.H. Assessment of acute sublethal effects of clothianidin on motor function of honeybee workers using video-tracking analysis. Ecotoxicology and environmental safety, volume 147, p. 200-205, ISSN 0147-6513, 2018.

ABDELKADER, F.B. *et al.* Effects of clothianidin on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in honey bee drone semen, *Journal of Apicultural Research*, 2019.

BADAWY, M.E.I.; NASR, H.M.; RABEA, E.I. Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. Apidologie 46, 177–193. <<https://doi.org/10.1007/s13592-014-0315-0>> 2015.

BADIOU-BÉNÉTEAU, A., *et al.* Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide Thiamethoxam. Ecotoxicol. Environ. Saf., New York, v. 82, p. 22–31, 2012.

BADAWY, M.E.I. *et al.* Toxicity and biochemical changes in the honey bee *Apis mellifera* exposed to four insecticides under laboratory conditions. Apidologie 46, 177–193, 2015.

BERNET, D. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22 (1), 25–34, 1999.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. Meliponini Lepeletier, 1836. In Moure, J. S., Urban, D.; Melo, G. A. R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region - online version. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <<http://www.moure.cria.org.br/catalogue>>, 2013.

CATAE, A.F. *et al.* Cytotoxic effects of thiamethoxam in the midgut and malpighian tubules of Africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Microsc. Res. Tech.* 77, 274e281, 2014.

CAETANO, F.H.; JAFFÉ, K.; CREWE, R.W. The digestive tract of the *Catantopus* ants: presence of the microorganisms in the ileum. 12th Congress of the International Union for the Study of Social Insects. p.391, 1994.

CAVALCANTE, V.M., CRUZ-LANDIM, C. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. Naturalia 24, 19e40, 1999.

CAVALCANTE, V.M., CRUZ-LANDIM, C. 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, 2004.

CHAM, K.O. *et al.* Pesticide exposure assessment paradigm for stingless bees. Environmental Entomology ;48(1):1-13, 2018.

CLARKSON, P.M.; THOMPSON, H.S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr.* 72(2):637-46, 2000.

CRUZ-LANDIM, C. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. Anais Acad. Ciências Est. São Paulo. 44: 28-49, 1985.

CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural features of the regenerative cells of the bees (Hymenoptera, Apidae) midguts. Sociobiology, Chico, v. 34, n. 3, p. 597-603, 1999.

CRUZ-LANDIM, C. *Abelhas - Morfologia e Função de Sistemas.* 1ª ed. São Paulo: Editora UNESP, p. 407, 2009.

CHAM, K.O. *et al.* Manual de Avaliação de Risco Ambiental de Agrotóxicos para Abelhas. 2. ed. Brasília: IBAMA/Diqua. 114, 2020.

COSTA, L.M. *et al.* Determination of acute lethal doses (LD50 and LC50) of imidacloprid for the native bee *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). *Sociobiology* 62, 578e582. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i4.792>, 2015.

DARY, O. *et al.* 1990. Microplate adaptation of Gomori's assay for quantitative determination of general esterase activity in single insects. *J. Econ. Entomol.* 83, 2187–2192, 1990.

DECIO, P. *et al.* Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam, Ecotoxicology and Environmental Safety, Volume 223,ISSN 0147-6513, 2021.

DEPLEDGE, M. H; FOSSI, M. C. The role of biomarkers in environmental assessment. 2 Invertebrates. Ecotoxicology, London, v. 3, p.161–172, 1994.

DEPLEDGE, M. H; AAGAARD, A; GYÖRKÖS, P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. Marine Pollution Bulletin, Oxford, v.31, p.19–27, 1995.

DESNEUX, N. *et al.* The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. Annu. Rev. Entomol. 52, 81e106, 2007.

DIAO, Q. *et al.* Tissue distribution and properties of glutathione S-transferases in *Apis cerana cerana* Fabricius and *Apis mellifera* ligustica Spinola. J.Apic.Res.45,145–152, 2006.

DRINGEN, R.; PAWLOWSKI, P.G.; HIRRLINGER, J. Peroxide detoxification by brains cells. Journal of Neuroscience Research. <https://doi.org/10.1002/jnr.20280>, 2004.

DORIGO, A.; ROSA-FONTANA, A.; CAMARGO, I.; NOCELLI, R.; MALASPINA, O. Biological Data of Stingless Bees with Potential Application in Pesticide Risk Assessments. Sociobiology, v. 65, p. 777, 2018.

FAUSER-MISLIN, A. *et al.* Influence of combined pesticide and parasite exposure on bumblebee colony traits in the laboratory. J. Appl. Ecol. 51, 2014.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. RAMB. 1997; 43(1):61-8, 1997.

FRIOL, P. S. *et al.* 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, out. 2017.

FELTHAM, H.; PARK, K.; GOULSON, D. Field realistic doses of pesticide imidacloprid reduce bumblebee pollen foraging efficiency. Ecotoxicology 23, 2014.

FERNÁNDEZ, F. Sistemática dos Himenópteros sociais da Região Neotropical. In: Vilela EF, Santos IA, Shoereder JH, Serrão JE, Campos LA, Lino-Neto J, eds. Insetos Sociais – da biologia à aplicação, 174–195. Viçosa: Editora UFV, 2008.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol Biochem. 48:909–930, 2010.

GRELLA, T. C.; SOARES-LIMA, H. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. Chemosphere, v. 236, 2019.

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

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

GOODMAN, L.J. Form and function in the honeybee. Cardiff: *International Bee Research Association*, 2003.

GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY, A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. Mol Diagn. 8:141–149, 2004.

GUNNING, R.V.; MOORES, G.D.; DEVONSHIRE, A.L. Esterases and fenvalerate resistance in a field population of *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. Pestic. Biochem. Physiol. 58, 155–162, 1997.

HAYAOKA, T.; DAUTERMAN, W. C. Induction of glutathione S-transferase by phenobarbital and pesticides in various house fly strains and its effect on toxicity, Pestic. Biochem. Physiol. 17, 113, 1982.

HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. Annu. Rev. Entomol. 44: 183–206, 1999.

HENRY, M. *et al.* A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. Science 336, 2012.

HERNANDO, M.D. *et al.* Viability of honeybee colonies exposed to sunflowers grown from seeds treated with the neonicotinoids thiamethoxam and clothianidin. Chemosphere, 2018.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Manual de Avaliação de Risco Ambiental de Agrotóxicos para Abelhas. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/reavaliacaoambiental/2017/2017-07-25-Manual-IBAMA-ARA-Abelhas-IN0217-WEB.pdf>, 2017.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Avaliação de risco ambiental do ingrediente ativo Clotianidina para insetos polinizadores. Parecer técnico n.º 2. Reavaliação ambiental. Acessado em maio de 2022. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/consultas-publicas/2269-consulta-publica-sobre-reavaliacao-ambiental-do-ingrediente-ativo-clotianidina-para-insetos-polinizadores>>, 2021.

JUNQUEIRA L.C.U., JUNQUEIRA L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Editora Santos, 123 p. 1983.

KAIRO, G. *et al.* *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. Sci Rep 7, 8556, 2017.

KERR, W.E. *et al.* Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação. -- Belo Horizonte, MG: Acangaú, p. 157, 1996.

KETTERMAN, A.J. *et al.* Single amino acid changes outside the active site significantly affect activity of glutathione S-transferases. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 31, n.1, p. 65-74, 2001.

KLETZIEN, R. F. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a housekeeping enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. FASEB J, 1994.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. Rev Nutr. 16(4):433-41, 2003.

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

KUNIEDA, T. *et al.* Carbohydrate metabolism genes and pathways in insects: insights from the honey bee genome. Insect Mol Biol; 15(5):563-76, 2006.

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

LUZZATTO, L., BATTISTUZZI, G. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. In: Harris, H., Hirschhorn, K. (eds) Advances in Human Genetics 14. Springer, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-9400-0_4>, 1985.

LI, X.; SCHULER, M. A; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. Annu. Rev. Entomol. 52, 231–253, 2007.

LUZ, C.F.P.de *et al.* Comparative floral preferences in nectar and pollen foraging by *Scaptotrigona postica* (Latreille 1807) in two different biomes in São Paulo (Brazil), Grana, 58:3, 200-226, DOI: 10.1080/00173134.2019.1579257, 2019.

MAXWELL, D.M. The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 114, 306–312, 1992.

MENDIBURU, F. Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-1. URL <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>, 2019.

MICHENER, C.D. The bees of the world. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2000.

MICHENER, C.D. The bees of the world (2nd edition). Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press, 2007.

MIOTELO, L. *et al.* A food-ingested sublethal concentration of thiamethoxam has harmful effects on the stingless bee *Melipona scutellaris*, Chemosphere, Volume 288, 132461, ISSN 0045-6535, 2022.

NIELSEN, S.A.; BRODSGAARD, C.J.; HANSEN, H. Effects on detoxification enzymes in different life stages of honey bees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera:Apidae) treated with a synthetic pyrethroid (flumethrin). Seventeenth Scandinavian Cell Toxicology Congress, v.28, p.437-443, 2000.

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

NAUEN, R. *et al.* Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants, Pesticide Biochemistry and Physiology, Volume 76, Issue 2, 2003.

OLIVEIRA, R.A. *et al.* Side-effects of thiamethoxam on the brain and midgut of the africanized honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Environ Toxicol. 2013.

OLIVEIRA, C.R. *et al.* Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. Chemosphere 236, 1–12, 2019.

PAL, E. *et al.* Toxicity of the Pesticides Imidacloprid, Difenoconazole and Glyphosate Alone and in Binary and Ternary Mixtures to Winter Honey Bees: Effects on Survival and Antioxidative Defenses. Toxics, v. 10, p. 104, 2022.

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Utilization of floral resources by species of *Melipona* (Apidae, Meliponina): Floral preferences. Apidologie 20: 185–195. doi:10.1051/apido:19890301,1989.

RENZI, M.T. *et al.* Chronic toxicity and physiological changes induced in the honey bee by the exposure to fipronil and *Bacillus thuringiensis* spores alone or combined. Ecotoxicol Environ Saf, 2016.

ROSA-FONTANA, A. S., *et al.* What is the most suitable native bee species from the Neotropical region to be proposed as model-organism for toxicity tests during the larval phase?. Environmental pollution, v. 265, p. 114849, 2020.

ROSSI, C. DE A. *et al.* Effects of sublethal doses of imidacloprid in malpighian tubules of africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). Microsc. Res. Tech. 76, 2013.

RYERSE, J.S. Developmental changes in Malpighian tubule cell structure. Tissue Cell 11 (3), 533–551, 1979.

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

SERRÃO, J. E.; CRUZ-LANDIM, C. Gut Structures In Adult Workers Of Necrophorous Neotropical Stingless Bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Entomologia Generalis, v. 19, n. 4, p. 261-265, 1995.

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

SCHNEIDER, C.W. *et al.* RFID Tracking of Sublethal Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on the Foraging Behavior of *Apis mellifera*. PLoS ONE, 7(1): e30023. 2012.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e Revista de Nutrição Rev. Nutr., Campinas, 23(4):629-643, adaptação ao treinamento físico. RBME. 2004; 10(10):308-13, 2010.

SILVA, C.I. *et al.* Guia Ilustrado de Abelhas Polinizadoras do Brasil. 1ª Edição. Usp, São Paulo – SP. 2014.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. *et al.* Structure and function of the intestine and Malpighian tubules: from bee biology to cell marker development for toxicological analysis. Chapter in *Social Insects: Structure, Function and Behavior*. Nova Science Publishers, USA, p. 27, 2010.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. Autophagy and apoptosis coordinate physiological cell death in larval salivary glands of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Autophagy 3 (5), 516–518, 2007.

SILVA-ZACARIN, E. C. M. *et al.* Protocol for optimization of histological, histochemical and immunohistochemical analyses of larval tissues: application in histopathology of honey bee. Current microscopy contributions to advances in science and technology, v 5, p 696-703, 2012.

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

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

SMIRLE, M.J.; WINSTON, M.L. Intercolony variation in pesticide detoxification by the honey bee (Hymenoptera: Apidae). Journal of Economic Entomology 80, 5–8, 1987.

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

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. Toxicology Letters, Amsterdam, v.128,, n. 1-3, p. 215-228, 2002.

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

SLAA, E. J. *et al.* Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. Apidologie. 37: 293–315, 2006.

STANTON, R.C. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, NADPH, and Cell Survival. IUBMB Life, 64(5): 362–369, May 2012.

TADEI, R. *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. Sci Rep. doi: 10.1038/s41598-019-39383-z. 1 Mar, 2019.

TADEI, R. *et al.* 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, 2020.

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

TAVARES, D.A. *et al.* Exposure of larvae to thiamethoxam affects the survival and physiology of the honey bee at post-embryonic stages, *Environmental Pollution*, V.229, pag 386-393, <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.092>>, 2017.

TERRA, W.R., FERREIRA, C. Biochemistry and molecular biology of digestion. In: Gilbete, L.I. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 365–418, 2012.

TRIOLA, M. F. *Introdução à estatística*. 10ª ed, 722 p., 2008.

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

VELTHUIS, B. J., VELTHUIS, H. H. W. Columbus surpassed: biophysical aspects of how stingless bees place an egg upright on their liquid food. Naturwissenschaften, 85(7), 330-333, 1998.

VERMA, R. S.; MEHTA, A.; SRIVASTAVA, N. In vivo chlorpyrifos induced oxidative stress: attenuation by antioxidant vitamins. Pestic.Biochem.Physiol 88, 191–196, 2007.

WITTER, S. *et al.* *As abelhas e a agricultura*. – Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 143, 2014.

WONGKOBROT, A; DAHLMAN, D. L. Larval *Manduca sexta* hemolymph carboxylesterase activity during chronic exposure to insecticide containing diets, *J. Econ. Entomol.* 69, 237, 1976.

YU, S.J.; ROBINSON, F.A.; NATION, J.L. Detoxication capacity in the honey bee, *Apis mellifera* L. Pestic.Biochem.Physiol.22,360–368, 1984.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

- Este estudo fornece dados essenciais para a caracterização dos riscos de exposição de abelhas nativas a clotianidina.
- A exposição larval a concentrações ambientalmente relevantes de clotianidina pode afetar a sobrevivência e o desenvolvimento de abelhas *S. postica*.
- A clotianidina apresentou maior toxicidade para as larvas, demonstrando ser o período mais crítico durante o desenvolvimento.
- Tanto a concentração recomendada no campo, quanto a concentração subletal, demonstraram alta toxicidade e, portanto, oferecem risco as populações de abelhas ao serem aplicadas para o tratamento de sementes.
- A clotianidina apresentou citotoxicidade nos órgãos de metabolização de substâncias, prejudicando as funções vitais desempenhadas por eles.
- A concentração de campo demonstrou modular significativamente a atividade das enzimas CaEs-3, GST e G6PD, sugerindo uma resposta celular em decorrência da exposição a clotianidina.