

---

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

---

EFEITOS DO INSETICIDA FLUPIRADIFURONA E DOS FUNGICIDAS  
PIRACLOSTROBINA E FLUXAPIROXADE NO COMPORTAMENTO E  
MORFOFISIOLOGIA DE *Melipona scutellaris*

LAIS VIEIRA BELLO INOUE

---

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

---

EFEITOS DO INSETICIDA FLUPIRADIFURONA E DOS FUNGICIDAS  
PIRACLOSTROBINA E FLUXAPIROXADE NO COMPORTAMENTO E  
MORFOFISIOLOGIA DE *Melipona scutellaris*

LAIS VIEIRA BELLO INOUE

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

Orientador: Dr. Osmar Malaspina

Coorientador: Dr. Caio Eduardo da Costa Domingues

Rio Claro – SP  
2025

I58e

Inoue, Lais Vieira Bello

Efeitos do inseticida flupiradifurona e dos fungicidas  
piraclostrobina e fluxapirroxade no comportamento e morfofisiologia  
de *Melipona scutellaris* / Lais Vieira Bello Inoue. -- Rio Claro, 2025  
35 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),  
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientador: Caio Eduardo da Costa Domingues

1. Abelha sem ferrão. 2. Agrotóxicos. 3. Ecotoxicologia. 4.  
Comportamento. 5. Morfologia. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Efeitos do inseticida flupiradifurona e dos fungicidas piraclostrobina e fluxapiroxade no comportamento e morfofisiologia de *Melipona scutellaris*

**AUTORA:** LAIS VIEIRA BELLO INOUE

**ORIENTADOR:** OSMAR MALASPINA

**COORDENADOR:** CAIO EDUARDO DA COSTA DOMINGUES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas

(Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:



Documento assinado digitalmente  
**OSMAR MALASPINA**  
Data: 10/01/2025 09:54:46-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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



Documento assinado digitalmente  
**ROBERTA CORNELIO FERREIRA NOCELLI**  
Data: 08/01/2025 15:51:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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



Documento assinado digitalmente  
**PAULO JOSE BALSAMO**  
Data: 07/01/2025 17:55:13-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. PAULO JOSÉ BALSAMO (Participação Virtual)  
Departamento de Coordenadoria de Sistemas Biomédicos / FATEC - Sorocaba

Rio Claro, 07 de janeiro de 2025

Dedico este trabalho aos meus pais, que muitas vezes abdicaram dos seus sonhos para que eu pudesse viver o meu.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Regina Inoue e Yoshi Inoue pelo incentivo e apoio incondicional ao longo de toda a minha trajetória acadêmica e por todo o exemplo de força, dedicação, determinação e amor.

Aos meus professores Osmar Malaspina e Caio Domingues por viabilizarem este trabalho e por todo o suporte durante estes sete anos. Agradeço também por serem os melhores mentores que um aluno poderia ter, além de cientistas incríveis, são pessoas admiráveis.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), em especial à Beatriz Lancia, por estar presente em quase todos os processos da pesquisa e ser meu braço direito inúmeras vezes.

Aos meus colegas da pós graduação do Laboratório de Ecologia e Sistemática de Fungos (LESF) Mateus Cruz e Raphael Silva, que me ajudaram em diversos momentos ao longo do mestrado.

Ao Vinicius Veiga por me apoiar, pelo suporte que me ofereceu de materiais e análises e por toda a inestimável companhia. Aos meus amigos, que sempre me motivaram e que nunca me permitiram me sentir sozinha nesse período, especialmente à Nattalia Neves e ao Victor Sales.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), ao Programa de Pós Graduação e à todos os funcionários por proporcionarem e viabilizarem uma formação de excelência.

À todos os membros da minha banca, principalmente à Roberta Nocelli e Paulo Balsamo, que foram essenciais para o aprimoramento do trabalho.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP por financiarem essa pesquisa e viabilizarem minha formação.

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

Processo nº 2023/02599-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Processo nº 2017/21097-3, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“O homem é parte da natureza e a sua guerra contra a natureza é, inevitavelmente, uma guerra contra si mesmo.”

Rachel Carson, 1962

## RESUMO

As abelhas nativas sem ferrão da espécie *Melipona scutellaris* são essenciais para os ecossistemas naturais e a alimentação humana. No entanto, estes insetos podem ser expostos a diversos estressores, sobretudo aos agrotóxicos. Os agrotóxicos são classificados de acordo com seus organismos alvos e são comercializados como produtos formulados. Considerando o impacto dos agrotóxicos em organismos não-alvo, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do inseticida à base de flupiradifurona e do fungicida à base de piraclostrobina e fluxapiroxade, de forma isolada e combinada na sobrevivência, comportamento e morfofisiologia do intestino médio e dos túbulos de Malpighi de forrageadoras de *M. scutellaris*. Para isso, forrageiras de *M. scutellaris* foram coletadas e divididas nos seguintes grupos experimentais: inseticida (6 ng/μL de flupiradifurona), fungicida (0,1 ng/μL de piraclostrobina e 0,05 ng/μL de fluxapiroxade) e inseticida + fungicida, sendo este uma mistura das duas soluções anteriores (flupiradifurona: 3 ng/μL, piraclostrobina: 0,05 ng/μL e fluxapiroxade: 0,025 ng/μL). Inicialmente, os indivíduos foram expostos cronicamente aos produtos por via oral para o registro de sobrevivência e, de acordo com o resultado, uma nova exposição foi realizada para avaliar o comportamento e índices de lesão dos órgãos. Os dados obtidos passaram por análises estatísticas utilizando o software GraphPad Prism. Os resultados obtidos demonstraram que as abelhas expostas aos agrotóxicos exibiram alta mortalidade em comparação ao grupo experimental de controle. Ainda, as abelhas do grupo inseticida registraram alterações significativas na mobilidade ao longo do experimento e, todos os grupos experimentais demonstraram alterações nas médias de velocidade média, número de paradas e distância percorrida. As imagens histológicas também revelaram a presença de três níveis de lesão no intestino médio (eliminação de células, secreção apócrina, esferocristais, vacuolização e núcleos picnóticos) e túbulos de Malpighi (esferocristais, vacuolização e núcleos picnóticos) após um breve período de exposição. Os dados inéditos obtidos neste trabalho revelaram que, mesmo em curto prazo, ambos os produtos formulados prejudicam a saúde e a sobrevivência das espécies, interrompendo a dinâmica interna da colônia e consequentemente levando ao seu enfraquecimento.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia; ensaios comportamentais; produtos formulados; túbulos de Malpighi; intestino médio; Meliponini

## ABSTRACT

Stingless native bees of *Melipona scutellaris* species are essential for natural ecosystems and human nutrition. However, these insects can be exposed to several stressors, especially pesticides. Pesticides are classified according to their target organisms and are sold as formulated products. Considering the impact of pesticides on non-target organisms, this study aimed to evaluate the effects of the insecticide based on flupyradifurone and the fungicide based on pyraclostrobin and fluxapyroxad, in isolation and in combination, on the survival, behavior and morphophysiology of the midgut and Malpighian tubules of *M. scutellaris* foragers. For this purpose, *M. scutellaris* foragers were collected and divided into the following experimental groups: insecticide (6 ng/ $\mu$ L flupyradifurone), fungicide (0.1 ng/ $\mu$ L pyraclostrobin and 0.05 ng/ $\mu$ L fluxapyroxad) and insecticide + fungicide, which is a mixture of the two previous solutions (flupyradifurone: 3 ng/ $\mu$ L, pyraclostrobin: 0.05 ng/ $\mu$ L and fluxapyroxad: 0.025 ng/ $\mu$ L). Initially, individuals were chronically exposed to the products orally to record survival and, according to the result, a new exposure was performed to evaluate the behavior and organ injury indices. The data obtained underwent statistical analysis using the GraphPad Prism software. The results obtained demonstrated that bees exposed to pesticides exhibited high mortality compared to the experimental control group. Furthermore, the bees in the insecticide group showed significant changes in mobility throughout the experiment, and all experimental groups demonstrated changes in the average speed, number of stops and distance traveled. Histological images also revealed the presence of three levels of injury in the midgut (cell elimination, apocrine secretion, spherocrystals, vacuolization and pyknotic nuclei) and Malpighian tubules (spherocrystals, vacuolization and pyknotic nuclei) after a brief period of exposure. The unpublished data obtained in this study revealed that, even in the short term, both formulated products harm the health and survival of the species, interrupting the internal dynamics of the colony and consequently leading to its weakening.

**Keywords:** Ecotoxicology; Behavioral assays; pesticide commercial formulations; Malpighian tubules; midgut; Meliponini.

## SUMÁRIO

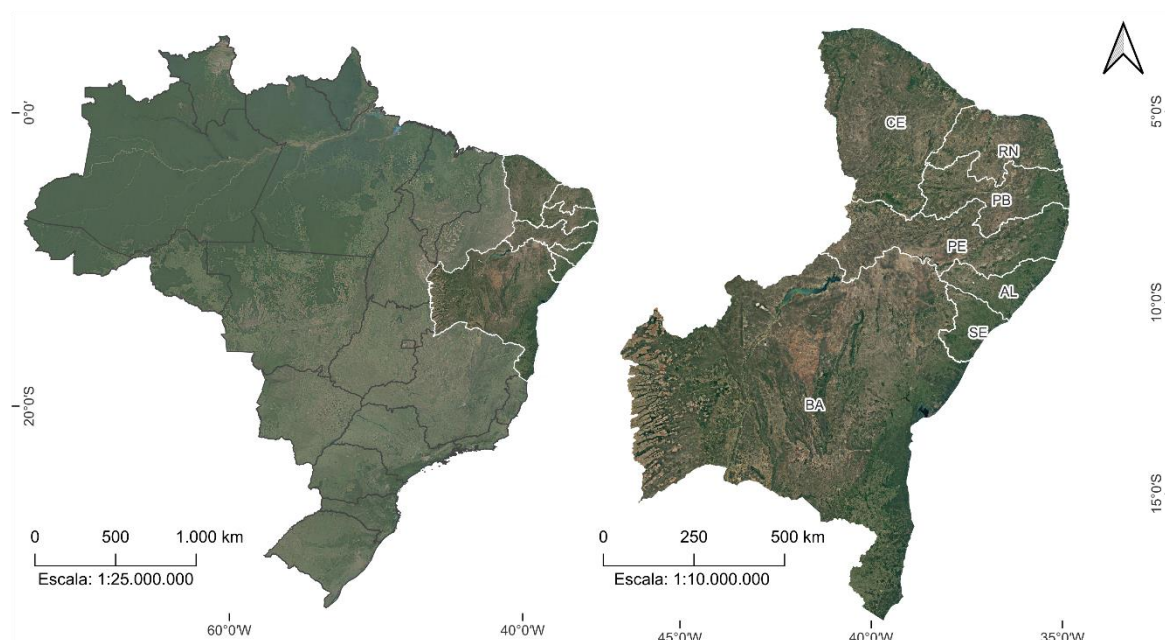
|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                              | <b>9</b>  |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                                   | <b>11</b> |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                       | <b>12</b> |
| <b>3.1. Coleta de indivíduos e agrotóxicos formulados .....</b>                         | <b>12</b> |
| <b>3.2. Bioensaios toxicológicos .....</b>                                              | <b>13</b> |
| <b>3.3. Aquisição e análise de dados comportamentais.....</b>                           | <b>14</b> |
| <b>3.4. Processamento histológico e análises qualitativas e semiquantitativas .....</b> | <b>14</b> |
| <b>3.5. Análises estatísticas .....</b>                                                 | <b>16</b> |
| <b>4. RESULTADOS.....</b>                                                               | <b>16</b> |
| <b>4.1. Taxa de sobrevivência.....</b>                                                  | <b>16</b> |
| <b>4.2. Alterações comportamentais .....</b>                                            | <b>17</b> |
| <b>4.3. Morfofisiologia e índice de lesão de órgãos.....</b>                            | <b>20</b> |
| <b>5. DISCUSSÃO.....</b>                                                                | <b>27</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                | <b>30</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas desempenham um papel crucial na polinização e são indispensáveis para o equilíbrio dos ecossistemas naturais, alimentação humana e economia (Khalifa et al., 2021). Ao longo do processo evolutivo, essa estreita relação entre plantas e abelhas resultou na seleção dos melhores mecanismos reprodutivos em espécies vegetais, incluindo a polinização por vibração, fenômeno observado em diferentes representantes das cinco famílias de abelhas: Andrenidae, Apidae, Colletidae, Halictidae e Megachilidae (Silva et al., 2010; Cardinal et al., 2018).

A polinização por vibração é caracterizada pela liberação do pólen presente nas flores com anteras poricidas, por meio da contração muscular de abelhas pousadas nessas flores. (Buchmann & Hurley, 1978). Essa vibração também é um componente-chave dos processos de comunicação e coleta de recursos em abelhas da espécie *Melipona scutellaris* (Latreille, 1811) (Hrncir et al., 2008; Vallejo-Marín, 2022). A espécie de abelha sem ferrão *M. scutellaris* é nativa dos estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe (Fig. 1) e, além de sua importância para a flora brasileira, essa espécie se destaca pela fácil domesticação e alta produtividade (Kerr, 1996; Pedro, 2014).

**Figura 1. Mapa do Brasil com destaque de ocorrência natural de *Melipona scutellaris***



**Legenda:** BA = Bahia; SE = Sergipe; AL = Alagoas; PE = Pernambuco; PB = Paraíba; RN = Rio Grande do Norte, CE = Ceará. **Fonte:** Mapa base: dados do mapa ©2015 Google. Estados brasileiros - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022. Sistema de Referência de Coordenadas: SIRGAS 2000 (EPSG:4674). Elaborado por Vinicius Veiga, 2023.

Embora sejam polinizadoras cruciais, o forrageamento em áreas de cultivo em grande escala representa riscos ao bem-estar e sobrevivência dessa espécie. Segundo Dolezal et al. (2019), a coleta de recursos provenientes de sistemas de monocultura constitui um fator limitante ao acesso à variabilidade floral e fornece uma dieta com baixo conteúdo nutricional. Além disso, esta condição ainda pode estar associada à perda de habitat naturais, fator que contribui para uma maior suscetibilidade a inimigos naturais e fraqueza da colônia. Somado à estas problemáticas do setor agrícola, as abelhas também podem ser expostas a agrotóxicos por aplicação tópica ou ingestão de recursos contendo resíduos (Boyel et al., 2019).

Os agrotóxicos são classificados de acordo com seus organismos-alvo e são comercializados na forma de produtos formulados que possuem um ou mais ingredientes ativos (i.a.) e ingredientes inertes, utilizados para aumentar a eficácia e a estabilidade dos ingredientes ativos (Klátyik et al., 2017). Neste sentido, compreender a composição e os mecanismos dessas formulações comerciais é fundamental para avaliar seus efeitos potenciais em organismos não-alvo (Kalyabina et al., 2021).

Um exemplo de produto formulado constituído por apenas um i.a. é o inseticida à base de flupiradifurona. Esta molécula pertence ao grupo químico das butenolidas e age como um agonista nos receptores nicotínicos de acetilcolina nAChRs em insetos alvos, impedindo a transmissão de sinal entre os neurônios nos sistemas nervoso central e periférico (Nauen et al., 2015). Ainda que seja eficaz no controle de pragas, estudos realizados com *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) demonstraram que este produto provoca efeitos similares aos neonicotinoides, como redução no tempo de sobrevivência e na alimentação dos indivíduos, bem como alteração no padrão comportamental (Rodrigues, 2021; Tosi et al., 2021).

Os produtos formulados ainda podem apresentar mais de um i.a. e grupo químico, como é observado para o fungicida comercial à base de piraclostrobina e fluxapiroxade, amplamente utilizado em lavouras para prevenir pragas fúngicas (MAPA, 2024). Ambas as moléculas têm mecanismos de ação que prejudicam a respiração metabólica mitocondrial em fungos (Bartlett et al., 2002; Avenot e Michailides, 2010). E em relação ao fungicida piraclostrobina, Duan et al. (2024) relataram que o i.a. pode causar disfunções metabólicas relacionadas à energia, armazenamento de nutrientes e imunidade, além de afetar o comportamento de *A. mellifera*.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (2024), o uso de ingredientes ativos na agricultura dobrou de 1990 a 2022, fator que favorece a carência informacional acerca dos efeitos subletais dos agrotóxicos nas abelhas. Nesse cenário, Malaspina e Silva-Zacarin (2006) evidenciam o intestino médio e os túbulos de Malpighi como órgãos-alvo para investigação dos impactos subletais dos agrotóxicos em abelhas. Esses órgãos

são amplamente utilizados para avaliar os riscos de exposição oral a pesticidas sistêmicos (Catae et al., 2017; Tadei et al., 2018; Decio et al., 2021; Serra et al., 2023), uma vez que o intestino médio é o órgão responsável pela absorção de nutrientes e os túbulos de Malpighi pela osmorregulação e excreção (Cruz-Landim, 1996; Chapman, 1998).

Com base nestes fatores, o presente estudo objetivou analisar os efeitos sob a sobrevivência, comportamento e morfofisiologia do intestino médio e dos túbulos de Malpighi em forrageadoras de *M. scutellaris* após a exposição oral isolada e combinada às formulações comerciais do inseticida à base de flupiradifurona e do fungicida à base de piraclostrobina e fluxapirroxade.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

As abelhas da espécie *Apis mellifera* são consideradas modelos excelentes de bioindicadores devido às suas características morfológicas adaptadas para o forrageamento, voos de longo alcance e recursos que podem ser armazenados por anos, gerando evidências da qualidade do ambiente ao longo do tempo (Bargańska; Ślebioda; Namieśnik, 2015). Neste sentido, as abelhas podem ser utilizadas como fontes informativas acerca de mudanças climáticas, presença de metais pesados, radioatividade e agrotóxicos (Girotti et al., 2020; Cunningham et al., 2022; Zavrtnik et al., 2024).

Todavia, a *A. mellifera* representa apenas uma espécie de abelha dentre as mais de 20.000 estimadas para o mundo e, embora sejam pertencentes ao mesmo grupo de insetos, as características interespecíficas podem sofrer diversas alterações (Michener, 2007). Somente no Brasil, estima-se a existência de mais de 1.500 espécies nativas de abelhas, incluindo as abelhas da tribo Meliponini (Embrapa, 2024). Os indivíduos dessa tribo são caracterizados pela ausência de ferrão e são indispensáveis para a flora nativa, além disso, possuem comportamento social, possibilitando a criação de colônias e comercialização de recursos pela meliponicultura (A.B.E.L.H.A, 2024).

De acordo com Real-Luna et al. (2022), o uso de abelhas da tribo Meliponini como bioindicadores é passível de aplicação e necessário para estudos de toxicidade a agrotóxicos. Entretanto, considerando inviabilidade da inclusão de todas as espécies para avaliação de toxicidade, um estudo conduzido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (2018) objetivou selecionar algumas abelhas nativas como indicadores chave, dentre elas, a espécie *M. scutellaris*.

A abelhas da espécie *M. scutellaris*, conhecidas popularmente como uruçú nordestina, são polinizadoras fundamentais e podem estar presentes em cultivos agrícolas, favorecendo o

aumento na qualidade e quantidade dos frutos (BPBES, 2017). Todavia, estes indivíduos estão sob risco de extinção e estudos demonstram que a espécie pode ser mais susceptível a exposição a agrotóxicos em relação a outras espécies como *Tetragonisca angustula*, *Scaptotrigona postica* e *Apis mellifera* (Lourencetti *et al.*, 2023; IBAMA, 2018). Neste sentido, surge a necessidade de priorizar indivíduos mais vulneráveis em avaliações de riscos, uma vez que estes podem fornecer dados mais sólidos e abrangentes sobre o impacto de agrotóxicos nos ecossistemas.

Embora esta espécie tenha um fator territorial limitante para ser utilizada como espécie modelo de estudos de toxicidade, ela está naturalmente presente em quase todos os estados do nordeste (Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará), a terceira maior região do Brasil (Pedro, 2014; Brasil, 2022). Além disso, a venda de ingredientes ativos (i.a.) somente nesses estados somam mais de 48.650 toneladas (IBAMA, 2024), fator potencialmente agravante à proteção da espécie nativa. Tendo em vista o comportamento social da espécie, a possível exposição aos agrotóxicos de forma indireta ou direta se demonstra ainda mais preocupante devido ao compartilhamento dos recursos e intenso contato físico entre os indivíduos (Kopit; Pitts-Singer, 2018).

De acordo com Tosi *et al.* (2022), as principais pesquisas acerca de efeitos subletais em abelhas estão relacionadas aos âmbitos comportamentais, cognitivos e fisiológicos; sendo as subcategorias de bioquímica, aprendizado e/ou memória e atividade a apresentarem maiores alterações após a exposição a agrotóxicos. Neste contexto, os estudos da área de ecotoxicologia que visam elucidar os efeitos subletais, que proporcionam impactos secundários nos indivíduos, são essenciais para o monitoramento da segurança das abelhas, uma vez que estes, a longo prazo, podem comprometer a sobrevivência de colônias e das espécies.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta de indivíduos e agrotóxicos formulados**

Gaiolas para abelhas foram previamente preparadas utilizando potes plásticos de 250 ml adaptados com furos em seu entorno para ventilação (1,2 mm) e furos na tampa (12 mm) para inserção do alimentador (microtubo de 2 ml) e remoção de abelhas mortas (15 mm).

A coleta de forrageiras de *M. scutellaris* foi realizada em quatro colônias não irmãs e visualmente saudáveis no meliponário da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) - campus de Rio Claro (22°23'48.9"S 47°32'38.2"W). O procedimento consistiu na inserção das gaiolas nas entradas das colônias de acordo com o método descrito

por Domingues *et al.* (2020) para a mesma espécie (n=15 por gaiola, em quadruplicatas). Após a coleta, as abelhas foram transportadas para o Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA) e aclimatadas em estufa incubadora sob condições semelhantes à de uma colônia de abelhas sem ferrão ( $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $70\%\pm 5\%$  UR e ausência de luz) para realização dos bioensaios toxicológicos. O N amostral foi determinado com base nas diretrizes de testes de toxicidade para abelhas *Apis* da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 1998a, 1998b).

O produto formulado contendo o inseticida flupiradifurona (CAS No. 951659-40-8; pureza:  $> 960$  g/kg; concentração: 200 g/L) e o produto formulado contendo os fungicidas piraclostrobina (CAS No. 175013-18-0; pureza: 994 g/kg; concentração: 333 g/L) e fluxapiroxade (CAS No. 907204-31-3; pureza:  $> 980,0$  g/kg; concentração: 167 g/L) foram diluídos em água destilada para a obtenção de uma solução estoque (inseticida: 10.000 ng/ $\mu\text{L}$  de flupiradifurona e fungicida: 16.650 ng/ $\mu\text{L}$  de piraclostrobina e 8.350 ng/ $\mu\text{L}$  de fluxapiroxade, ambas com volume final de 20 ml).

Em seguida, as soluções passaram por uma diluição seriada até a obtenção das doses desejadas: flupiradifurona a 6 ng/ $\mu\text{L}$  (6 ppm) (Siviter e Muth, 2020), piraclostrobina a 0,1 ng/ $\mu\text{L}$  (0,1 ppm) e fluxapiroxade a 0,05 ng/ $\mu\text{L}$  (0,05 ppm) (Rondeau e Raine, 2022). Além disso, o estudo de Tosi e Nieh (2019) também foi considerado, com base no pior cenário de exposição para flupiradifurona, considerando a ingestão de abelhas durante o forrageamento, bem como estudos anteriores sobre a exposição oral de abelhas à piraclostrobina (Pettis *et al.*, 2013; Domingues *et al.*, 2020a, 2020b; Assis 175 *et al.*, 2022; Inoue *et al.*, 2022; Farder-Gomes *et al.*, 2024a).

### 3.2. Bioensaios toxicológicos

As abelhas forrageiras coletadas foram divididas em quatro grupos de quadruplicatas (n=60) de acordo com sua dieta: controle (CL), inseticida (IS), fungicida (FN) e inseticida + fungicida (IF), que consistiam em diferentes soluções de sacarose (1:1 água/açúcar). O grupo IS foi exposto ao inseticida à base de flupiradifurona (6 ng/ $\mu\text{L}$ ); o FN foi exposto ao fungicida contendo piraclostrobina (0,1 ng/ $\mu\text{L}$ ) e fluxapiroxade (0,05 ng/ $\mu\text{L}$ ); e o grupo IF recebeu uma mistura de ambas as soluções diluídas (flupiradifurona a 3 ng/ $\mu\text{L}$ , piraclostrobina a 0,05 ng/ $\mu\text{L}$  e fluxapiroxade a 0,025 ng/ $\mu\text{L}$ ).

O primeiro bioensaio consistiu em uma avaliação de sobrevivência por meio de uma alimentação *ad libitum*, que se estendeu por sete dias (168 horas). Durante este período, as inspeções ocorreram em intervalos de 4 horas para remover e registrar os indivíduos mortos.

Após, um segundo bioensaio foi realizado utilizando o método descrito anteriormente para avaliar o comportamento e o índice de lesão no intestino médio e nos túbulos de Malpighi. No entanto, devido à breve e significativa mortalidade dos indivíduos presentes em IS, uma avaliação de tempo de exposição adicional foi necessária para os grupos experimentais CL e IS. Portanto, os indivíduos de CL e IS foram divididos em dois subgrupos com base no tempo de exposição (2 e 4 horas). Em contraste, as abelhas de IF e FN foram avaliadas apenas após 4 horas de exposição.

### **3.3. Aquisição e análise de dados comportamentais**

A avaliação comportamental foi baseada na metodologia descrita por Bernardes *et al.* (2022) e Batista *et al.* (2023), com adaptações. Desta forma, após 2 horas de exposição, cinco indivíduos de cada colônia dos grupos experimentais CL e IS (n=20) foram transferidos para arenas - placas de Petri (90×20 mm) com tampas transparentes - e filmados por um período de 10 minutos sob luz natural a uma temperatura de  $28 \pm 1$  °C. O mesmo procedimento foi repetido após 4 horas de exposição para todos os grupos experimentais (CL, IS, FN e IF).

Os vídeos foram processados usando o software baseado em inteligência artificial Ethoflow® (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, Brasil, BR 512020 000737 6; Bernardes *et al.*, 2021), que reconhece o movimento dos indivíduos e gera dados em planilhas. As arenas foram avaliadas individualmente (n=24 indivíduos por grupo experimental), resultando em um total de 24 planilhas contendo dados da distância percorrida (cm), velocidade média (cm/s) e número de paradas. Para cada grupo experimental/período de exposição (CL – 2h e 4h, IS – 2h e 4h, FN – 4h e IF – 4h) foram obtidas 4 planilhas e os parâmetros foram agrupados de acordo com seu tratamento às análises estatísticas.

### **3.4. Processamento histológico e análises qualitativas e semiquantitativas**

Em paralelo às gravações para as análises comportamentais, cinco indivíduos de cada grupo experimental foram anestesiados em baixa temperatura (4 °C) para coleta dos túbulos do intestino médio e de Malpighi. A dissecação foi realizada após 2 horas de exposição para os grupos CL e IS e após 4 horas para todos os grupos experimentais (CL, IS, FN e IF) em temperatura ambiente sob estereomicroscópio (Leica EZ4hD) utilizando uma solução salina para insetos (0,1 M NaCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Em seguida, os órgãos foram transferidos individualmente para microtubos (Eppendorf®, 2 ml) e imersos em uma solução fixadora de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4 por 24 horas e desidratados em soluções crescentes

de etanol (15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 90%, 95% e 100%) a 4°C, conforme descrito por Silva-Zacarin *et al.* Em seguida, os órgãos foram incluídos em historesina conforme instruções do fabricante (Historesin Embedding Kit - Leica) e submetidos à microtomia (Leica RM 2255) na espessura de 6 µm. As secções histológicas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), conforme protocolo de Junqueira e Junqueira (1983).

As amostras obtidas foram analisadas em microscopia de luz (Olympus BX51) por meio de registros fotográficos de seis lâminas de cada indivíduo. Para os intestinos foi estabelecido como critério de captura para a região média e, para os túbulos de Malpighi, os cortes foram selecionados de modo randômico. No total, foram analisadas 30 fotografias de cada órgão de todos os grupos experimentais e períodos de exposição.

A partir das imagens obtidas, foram realizadas análises qualitativas e semiquantitativas das lesões nos órgãos. Os protocolos desenvolvidos para abelhas por Oliveira *et al.* (2019) e Grella *et al.* (2019) foram utilizados para identificar lesões nos órgãos de interesse. Os índices de danos foram avaliados adaptando a metodologia de Bernet *et al.* (1999), conforme descrito por Grella *et al.* (2019) e Domingues *et al.* (2020). As lesões foram classificadas de acordo com o nível de dano citológico: reversível (nível 1) - secreção apócrina, eliminação celular e esferocristais; moderadamente reversível (nível 2) - vacuolização celular; e irreversível (nível 3) - picnose celular. Ainda, cada lesão foi posteriormente ranqueada com base em sua ocorrência, sendo: 0 - nenhuma ocorrência; 1 – pouca ocorrência; 2 - ocorrência moderada; e 3 - ocorrência grave (Tabela 1). A média de lesões totais também foi realizada para os dois órgãos em cada grupo experimental.

**Tabela 1. Critérios de avaliação das lesões encontradas no intestino médio e túbulos de Malpighi de *Melipona scutellaris***

| <b>Tipos e níveis de lesões</b>     | <b>Ocorrência para cada lesão</b> |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Reversíveis – Nível 1               | 0 – Nenhuma                       |
| Moderadamente reversíveis – Nível 2 | 1 – Pouca                         |
| Irreversíveis – Nível 3             | 2 – Moderada                      |
|                                     | 3 – Severa                        |

**Legenda:** Classificação dos níveis de lesões de acordo com sua reversibilidade e presença observada em microscopia de luz nos órgãos de interesse (intestino médio e túbulos de Malpighi).

### **3.5. Análises estatísticas**

Com base nos dados obtidos no bioensaio toxicológico, o modelo de regressão de Cox foi utilizado para determinar a probabilidade de sobrevivência individual após a exposição aos agrotóxicos.

Em relação ao comportamento, os dados brutos gerados pelo software Ethoflow® foram utilizados para determinar as médias de velocidade média (cm/s), número de paradas e distância percorrida (cm), por meio de análise estatística descritiva para cada grupo experimental. Os dados comportamentais também foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e os valores dos grupos experimentais foram comparados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparações múltiplas (pós-teste de Dunn). Os dados brutos do Ethoflow® também foram aplicados ao programa Jupyter Notebook para gerar imagens de rastreamento e desempenho individual.

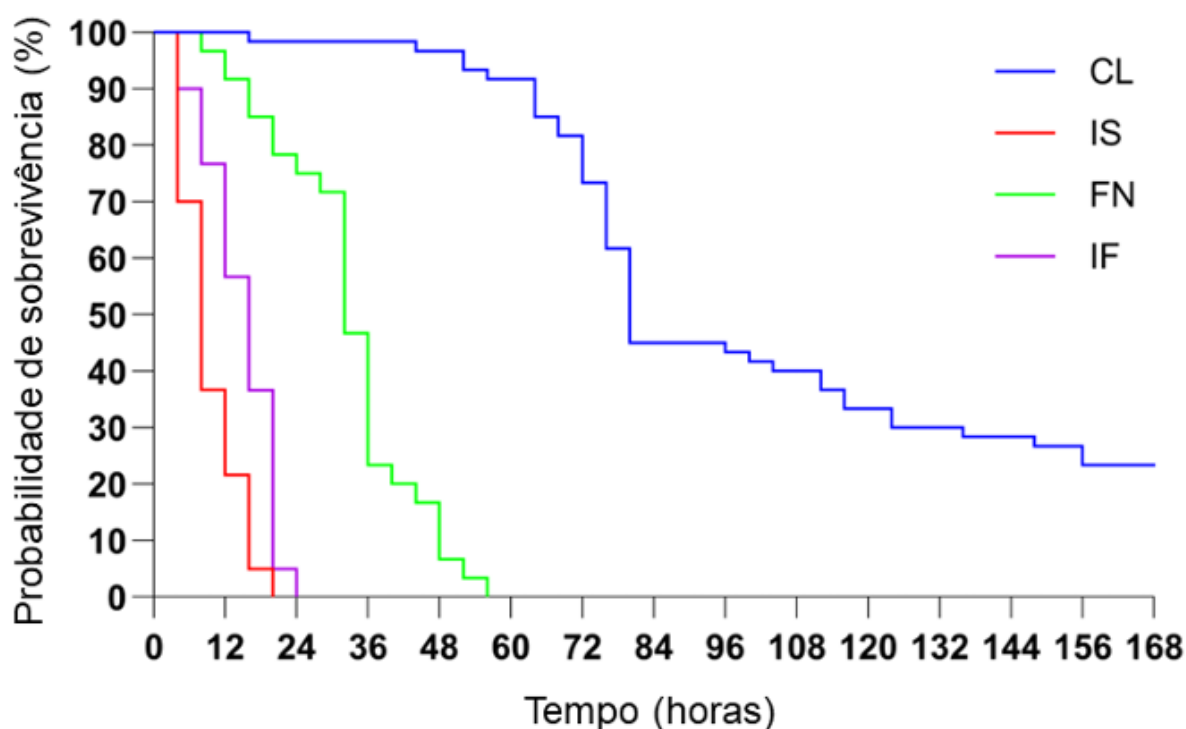
Já para os índices de lesões dos órgãos foram utilizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, seguido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn para modelos de comparação múltipla. Ambas as análises de comparação consistiram em avaliar os valores de CL e IS após 2 horas de exposição, bem como CL e todos os grupos experimentais após 4 horas de exposição (IS, FN e IS). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 10.3.1.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Taxa de sobrevivência**

A exposição aos agrotóxicos provou ser um fator crítico para a sobrevivência das abelhas, ainda que a curto prazo. Considerando a mortalidade de todos os indivíduos em cada grupo experimental, IS foi o primeiro a atingir 100% de mortalidade (20 h), seguido por IF (24 h) e FN (56 h) (Fig. 2).

**Figura 2. Modelo de regressão de Cox para probabilidade de sobrevivência de *Melipona scutellaris* após exposição a produtos formulados**



**Legenda:** IS: inseticida à base de flupiradifurona (6ng/μL), FN: fungicida à base de piraclostrobina (0,1ng/μL) e fluxapirroxade (0,05ng/μL) e IF: inseticida + fungicida (flupiradifurona: 3ng/μL, piraclostrobina: 0,05ng/μL e fluxapirroxade: 0,025ng/μL). n=60 abelhas por grupo experimental. Os grupos experimentais IS, FN e IF apresentaram diferença estatística ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo CL.

De acordo com os resultados, os grupos experimentais IS e FN apresentaram dois períodos de maior mortalidade dos indivíduos (IS: 4h, n=18 e 8h, n= 20; FN: 32h, n=15 e 36h, n=14). Ainda, o grupo experimental IF exibiu máxima taxa de letalidade em 20 horas (n=19). A análise estatística também indicou que o tempo médio de mortalidade dos indivíduos expostos aos produtos formulados foi significativamente menor do que o do grupo experimental CL ( $p < 0,0001$ ). Comparado a CL, o grupo experimental IS apresentou uma redução de 90% na expectativa de vida, seguido pelo IF com uma redução de 80% e FN com uma redução de 60%.

#### 4.2. Alterações comportamentais

O processamento individual das arenas geradas pelo software Ethoflow® resultou em > 97% de veracidade para os 18.000 frames de cada gravação e 24 planilhas de dados brutos. As análises realizadas para os dados de CL e IS (2h) evidenciaram mudanças significativas nas médias de velocidade média ( $p < 0,0001$ ), número de paradas ( $p < 0,0001$ ) e distância percorrida

( $p < 0,0001$ ), conforme a Tabela 2. Os mesmos valores de significância foram exibidos entre CL e todos os grupos experimentais após 4 horas de exposição.

O resultado obtido no IS após 4 horas de exposição demonstrou uma diminuição significativa na velocidade média e na distância percorrida, enquanto o número de paradas aumentou em comparação às primeiras 2 horas ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 2). O rastreamento também permitiu visualizar a atividade dos indivíduos.

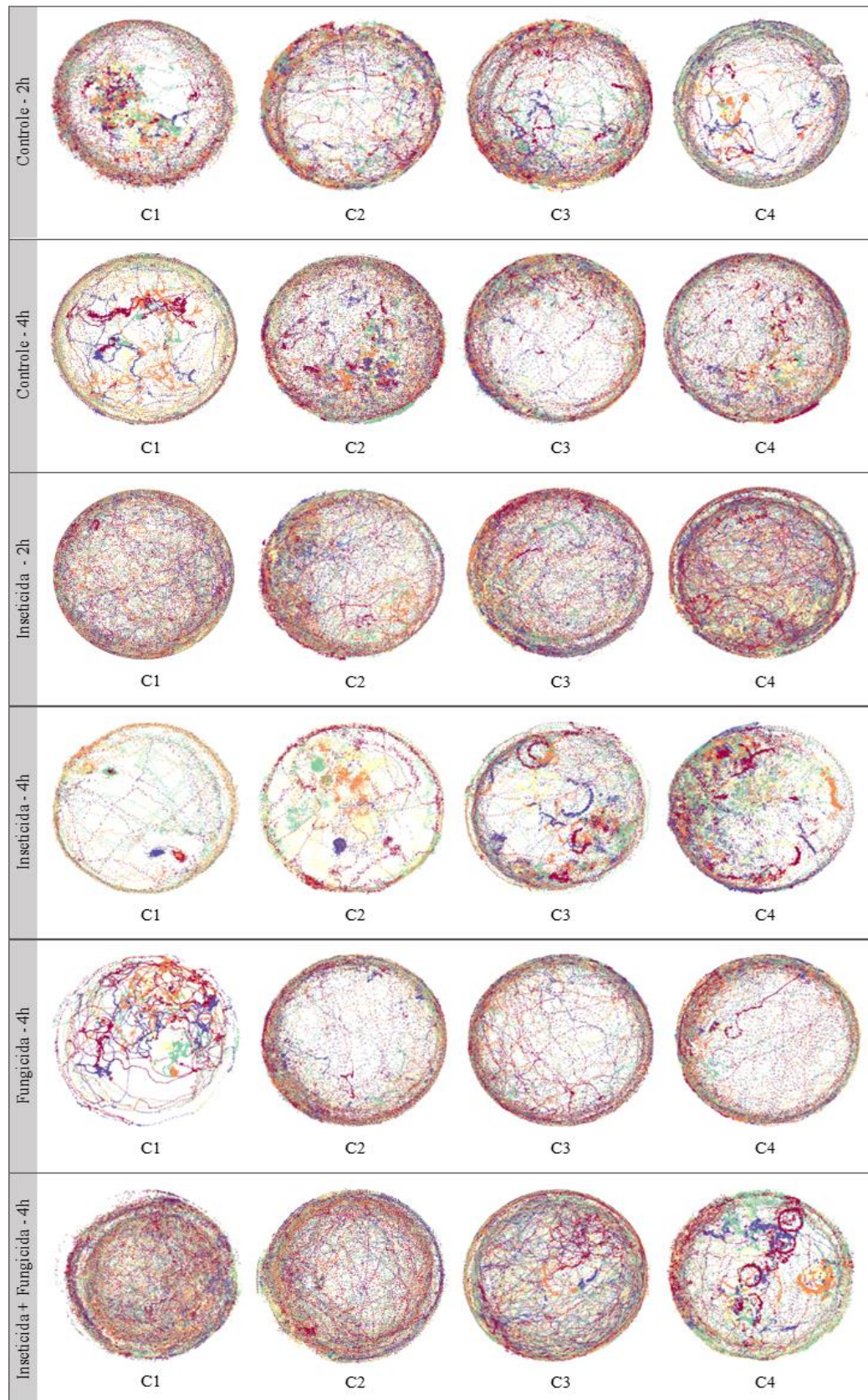
**Tabela 2. Avaliação comportamental de *Melipona scutellaris* após exposição a produtos formulados**

|    |    | Velocidade média<br>(cm/s) | Número de paradas          | Distância percorrida<br>(cm) |
|----|----|----------------------------|----------------------------|------------------------------|
| 2h | CL | $1.865 \pm 0.001$          | $12694.0 \pm 2.557$        | $1114.0 \pm 0.566$           |
|    | IS | $3.512 \pm 0.001^{****}$   | $8116.0 \pm 1.475^{****}$  | $1951.0 \pm 0.423^{****}$    |
| 4h | CL | $2.111 \pm 0.001$          | $10869.0 \pm 2.111$        | $1266.0 \pm 0.778$           |
|    | IS | $1.257 \pm 0.001^{****}$   | $12524.0 \pm 2.611^{****}$ | $754.0 \pm 0.802^{****}$     |
|    | FN | $3.492 \pm 0.003^{****}$   | $8862.0 \pm 7.463^{****}$  | $2095.0 \pm 1.703^{****}$    |
|    | IF | $2.399 \pm 0.001^{****}$   | $10568.0 \pm 2.868^{****}$ | $1443.0 \pm 0.384^{****}$    |

**Legenda:** Valores médios de velocidade, número de paradas e distância percorrida, obtidos por análise comportamental de vídeo utilizando o software Ethoflow e análise estatística de comparação múltipla utilizando o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. \*\*\*\*\*:  $p < 0.0001$

Ao longo das gravações, as abelhas expostas ao inseticida (2h e 4h) exibiram um resultado contrastante na mobilidade ao longo dos períodos de avaliação. Além disso, os indivíduos do grupo FN demonstraram preferência por caminhar ao longo do perímetro das arenas, exceto a colônia 1, que demonstrou baixa atividade. As abelhas do grupo experimental IF apresentaram rastreamento semelhante do grupo experimental IS-2h nas colônias 1, 2 e 3 e de IS-4h na colônia 4 (Fig. 3).

**Figura 3. Mapeamento dos indivíduos de *Melipona scutellaris* após exposição oral do inseticida a base de flupiradifurona e fungicida a base de piraclostrobina e fluxapiroxade**



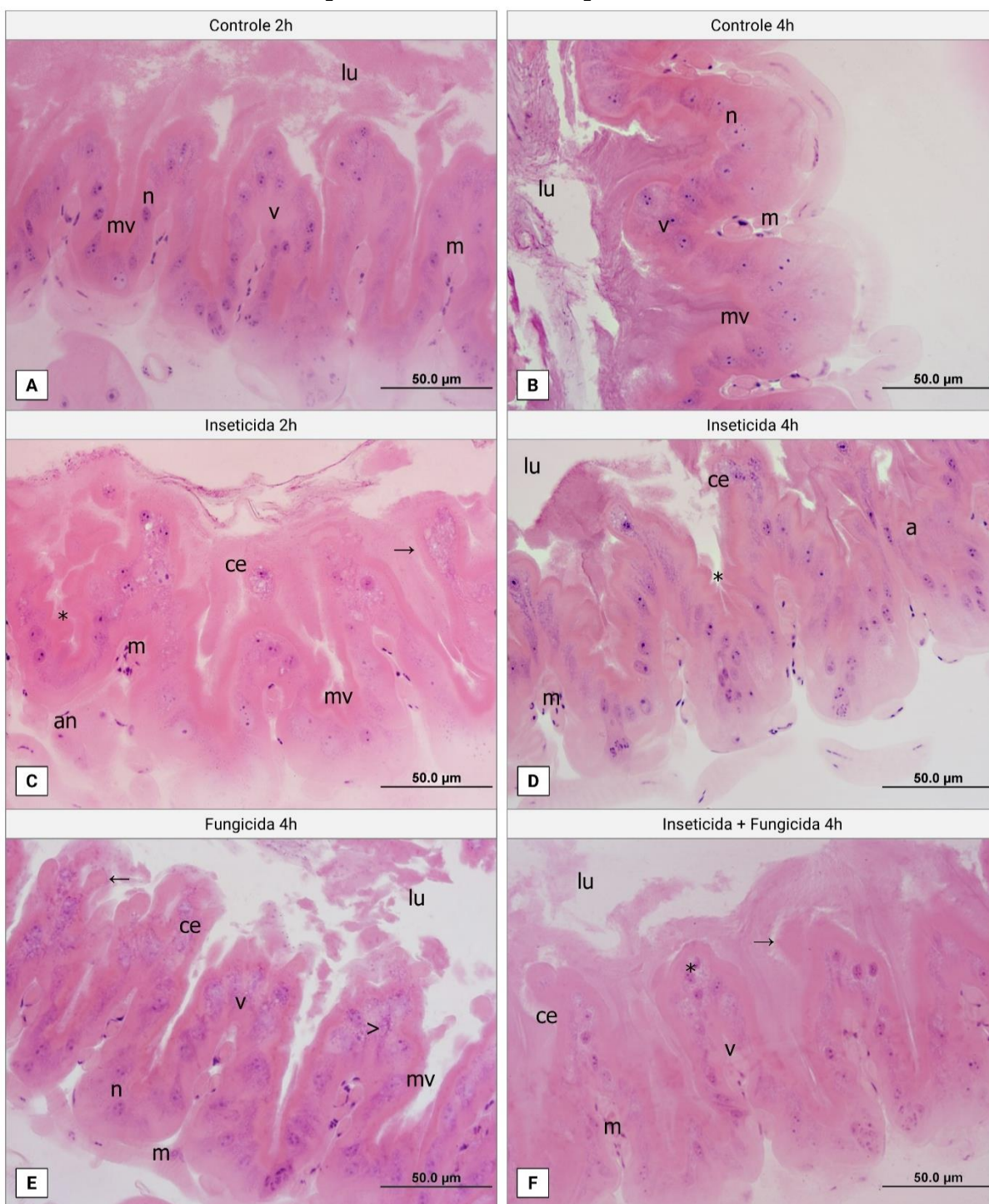
**Legenda:** Representação visual do rastreamento do movimento das abelhas nas arenas (90x20 mm) durante 10 minutos. Traços pontilhados representam o percurso realizado pelos indivíduos ao longo das gravações, sendo as diferentes cores a distinção entre os indivíduos. C = colônia. Controle: abelhas expostas a solução de sacarose, sem agrotóxicos (1:1 água e açúcar); Inseticida: abelhas expostas ao inseticida a base de flupiradifurona (6ng/μL de i.a.); Fungicida: abelhas expostas ao fungicida a base de piraclostrobina e fluxapiroxade (0.1ng/μL de piraclostrobina e 0.05ng/μL de fluxapiroxade) e Inseticida + Fungicida: abelhas expostas a diluição dos dois produtos formulados combinados (3ng/μL de flupiradifurona, 0.05ng/μL de piraclostrobina e 0.025ng/μL de fluxapiroxade). n=5 indivíduos por arena. n=20 indivíduos por grupo experimental. Dados obtidos pelo software Ethoflow e processados pelo programa Jupyter Notebook.

#### 4.3.Morfofisiologia e índice de lesão de órgãos

O intestino médio das abelhas do grupo experimental CL (2h e 4h) apresentou vilosidades e borda em escova bem definidas, lúmen limpo e baixo nível de lesões, demonstrando uma histoarquitetura de intestino médio integrada (Figs. 4A e 4B). Entretanto, as abelhas dos grupos IS (2h e 4h) e IF apresentaram um número significativo de eliminação celular na área analisada (Figs. 4C, 4D e 4F), além disso essas células eliminadas também apresentaram a presença de pequenos grânulos (inclusões).

Embora a presença de secreção apócrina não tenha apresentado alterações significativas para as análises semiquantitativas de FN (Fig. 6B), alguns registros do intestino médio demonstraram aumento em sua eliminação (Figs. 4C-F). Para os indivíduos do grupo IS (4h), também foram observadas alterações na histoarquitetura do intestino médio, caracterizadas por vilosidades não definidas e variação no padrão de formato da borda em escova (Fig. 4D). Também foi observada vacuolização no intestino médio dos indivíduos IF (Figs. 4F).

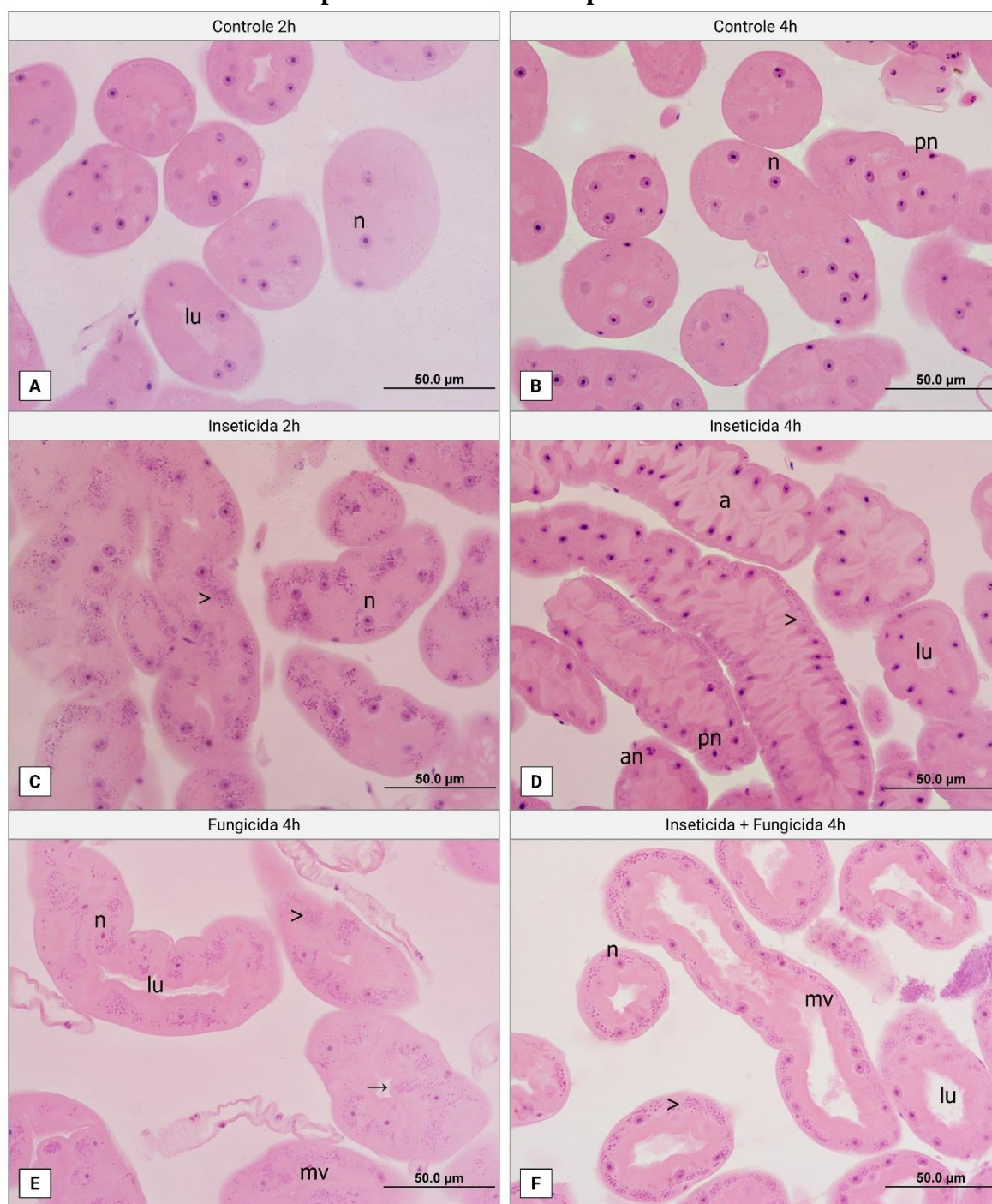
**Figura 4. Análise morfológica histológica do intestino médio de forrageiras de *Melipona scutellaris* após exposição ao inseticida a base de flupiradifurona e fungicida a base de piraclostrobina e fluxapiroxade**



**Legenda:** ce = eliminação celular; h = histoarquitetura modificada lu = lúmen; m = músculo; mv = agrupamento de microvilosidades (borda em escova); n = núcleo; v = vilosidade; → = secreção apócrina. Controle: abelhas expostas a solução de sacarose, sem agrotóxicos (1:1 água e açúcar); Inseticida: abelhas expostas ao inseticida a base de flupiradifurona (6ng/μL de i.a.); Fungicida: abelhas expostas ao fungicida a base de piraclostrobina e fluxapiroxade (0.1ng/μL de piraclostrobina e 0.05ng/μL de fluxapiroxade) e Inseticida + Fungicida: abelhas expostas a diluição dos dois produtos formulados combinados (3ng/μL de flupiradifurona, 0.05ng/μL de piraclostrobina e 0.025ng/μL de fluxapiroxade). Secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina. n=5 indivíduos por grupo.

Em relação aos túbulos de Malpighi dos indivíduos, o grupo CL apresentou órgãos com baixos níveis de esferocristais (2h e 4h), vacuolização (2h e 4h) e ausência de núcleos picnóticos. Os órgãos também apresentaram estruturas bem definidas (Figs. 5A e 5B). Em contraste, esferocristais e vacuolização foram registrados em altos níveis para todos os grupos experimentais (Figs. 5C-F). Picnose também foi observada no grupo experimental IS (2h e 4h). Por fim, as imagens também revelaram alterações na histoarquitetura das abelhas expostas ao inseticida após 4h (IS), incluindo células localizadas exclusivamente na periferia do órgão e sem lúmen visível (Fig. 5D).

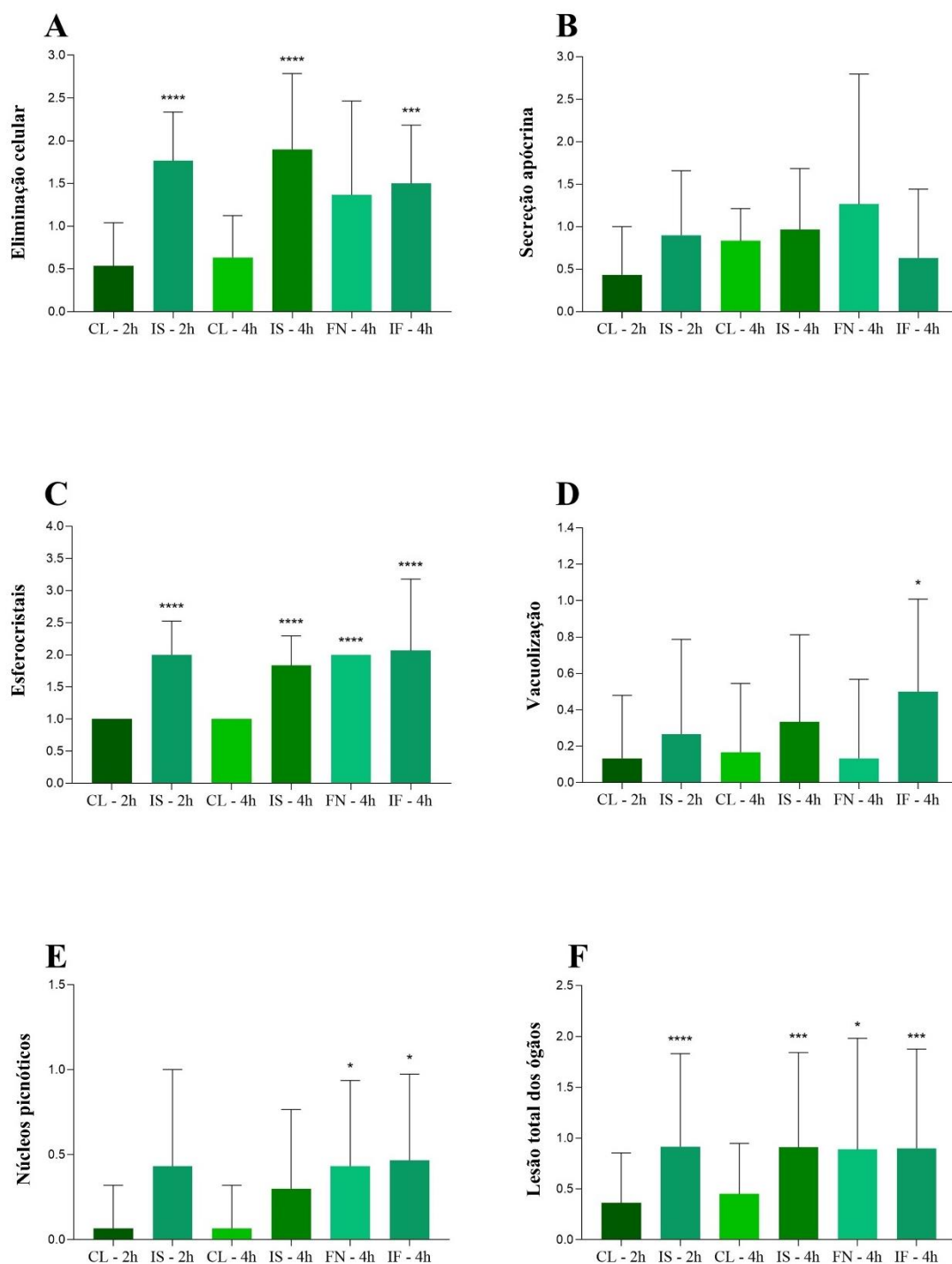
**Figura 5. Prancha histológica dos túbulos de Malpighi de forrageiras de *Melipona scutellaris* após exposição ao inseticida a base de flupiradifurona e fungicida a base de piraclostrobina e fluxapiroxade**



**Legenda:** ce = eliminação celular; h = histoarquitetura modificada lu = lúmen; m = músculo; mv = agrupamento de microvilosidades (borda em escova); n = núcleo; v = vilosidade; → = secreção apócrina. Controle: abelhas expostas a solução de sacarose, sem agrotóxicos (1:1 água e açúcar); Inseticida: abelhas expostas ao inseticida a base de flupiradifurona (6ng/μL de i.a.); Fungicida: abelhas expostas ao fungicida a base de piraclostrobina e fluxapiroxade (0.1ng/μL de piraclostrobina e 0.05ng/μL de fluxapiroxade) e Inseticida + Fungicida: abelhas expostas a diluição dos dois produtos formulados combinados (3ng/μL de flupiradifurona, 0.05ng/μL de piraclostrobina e 0.025ng/μL de fluxapiroxade). Secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina. n=5 indivíduos por grupo.

Os intestinos médios de *M. scutellaris* nos grupos experimentais IS (2h e 4h) ( $p < 0,0001$ ) e IF ( $p < 0,001$ ) apresentaram valor significativo de eliminação celular em comparação aos indivíduos CL (Fig. 6A). Todos os grupos experimentais apresentaram excesso de esferocristais ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 6C). O grupo IF também se destacou pelo índice de vacuolização ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6D). Ambos os grupos experimentais FN e IF apresentaram  $p < 0,05$  para núcleos picnóticos em comparação ao grupo experimental controle (Fig. 6E). Com exceção dos dados evidenciados, não se observou modificações significativas para os órgãos.

**Figura 6.** Índice de lesão do intestino médio de *Melipona scutellaris* após a ingestão do inseticida a base de flupiradifurona e fungicida a base de piraclostrobina e fluxapiroxade

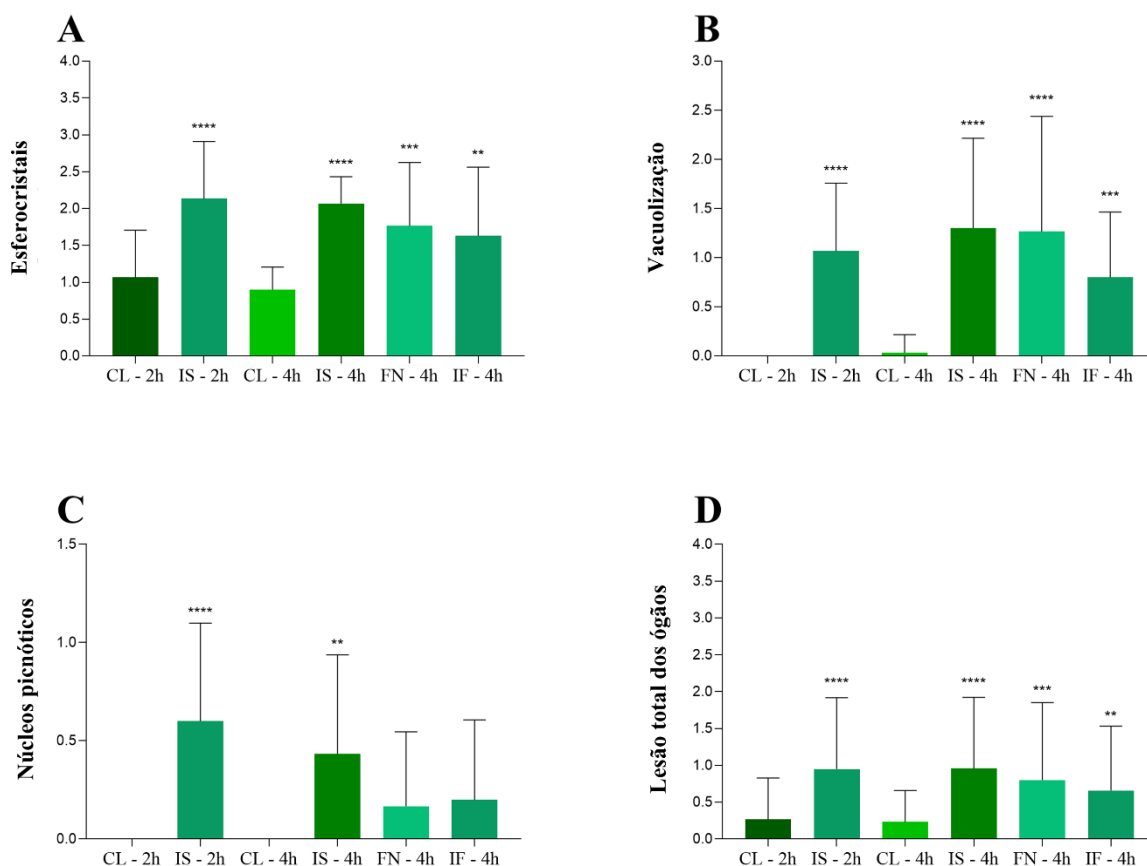


**Legenda:** (A) Índice de secreção apócrina; (B) índice celular eliminado; (C) índice de esferocristais; (D) índice de vacuolização; (E) índice de núcleos picnóticos; (F) índice total de órgãos. Análises estatísticas obtidas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Asteriscos em A, C, D, E e F indicam diferença estatística (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

Já para os túbulos de Malpighi, as abelhas do grupo experimental IS (2h) apresentaram as maiores taxas de alterações ( $p < 0,0001$ ) para os três tipos de lesões encontradas: esferocristais (Fig. 7A), vacuolização (Fig. 7B) e picnose celular (Fig. 7C), em comparação às abelhas do grupo CL (2h). Além disso, os indivíduos do grupo IS expostos por 4 horas também demonstraram altos níveis de esferocristais (Fig. 7A) ( $p < 0,0001$ ), vacuolização (Fig. 7B) ( $p < 0,0001$ ) e picnose celular (Fig. 7C) ( $p < 0,01$ ) quando comparados ao CL (4h). O grupo experimental FN também apresentou alterações nos níveis de esferocristais ( $p < 0,001$ ) e vacuolização ( $p < 0,0001$ ) em relação ao CL (4h). Por fim, foram observados para indivíduos do grupo experimental IF esferocristais ( $p < 0,01$ ) e vacuolização ( $p < 0,001$ ).

A comparação entre os dois períodos para o grupo CL (2h e 4h) não indicou alterações significativas no índice de lesão, e o mesmo foi observado para as abelhas do grupo IS (2h e 4h).

**Figura 7. Índice de lesão dos túbulos de Malpighi de *Melipona scutellaris* após a ingestão do inseticida a base de flupiradifurona e fungicida a base de piraclostrobina e fluxapiroxade**



**Legenda:** (A) Índice de esferocristais; (B) vacuolização; (C) índice de núcleos picnóticos; (D) índice total de órgãos. Análises estatísticas obtidas por Kruskal 20 Teste de Wallis e pós-teste de Dunn. Os asteriscos em A, B, C e D indicam diferença estatística (\*:  $p < 0,01$ ; \*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ).

## 5. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, os agrotóxicos avaliados podem causar efeitos adversos em abelhas forrageiras de *M. scutellaris*. Essas novas descobertas demonstram que os produtos formulados à base de flupiradifurona; piraclostrobina e fluxapirroxade, usados isoladamente ou em combinação podem provocar danos subletais de comportamento e na morfofisiologia do intestino médio e túbulos de Malpighi, bem como imobilidade e significativa mortalidade dos indivíduos, mesmo após um curto período de exposição.

De acordo com um estudo de campo conduzido por Campbell *et al.* (2016), o inseticida à base de flupiradifurona, quando aplicado dentro dos padrões de segurança, não causa danos significativos à sobrevivência das colônias de abelhas da espécie *A. mellifera*. Todavia, pesquisas mais recentes para a mesma espécie, utilizando doses realísticas de campo, demonstraram que o inseticida provoca um aumento na taxa de letalidade em indivíduos em fase larval e de forrageamento, bem como pode contribuir para o comprometimento de padrões imunológicos (Al Naggar & Baer, 2019; Guo *et al.*, 2021).

Além disso, estudos conduzidos por Miotelo *et al.* (2021) e Sales *et al.* (2022) enfatizam a maior suscetibilidade de *M. scutellaris* em comparação a *A. mellifera*, sendo este fator alarmante para a espécie nativa. Domingues *et al.* (2020a, 2020b) também enfatizaram a diferença de sensibilidade entre essas duas espécies após exposição oral ao ingrediente ativo piraclostrobina, com indivíduos de *M. scutellaris* apresentando uma taxa de sobrevivência reduzida. Em relação ao fluxapirroxade, seus efeitos isolados em abelhas ainda não são totalmente compreendidos, todavia, sua combinação com inseticidas pode promover diferentes curvas de probabilidade de sobrevivência em análises interespecíficas (Azpiazu *et al.*, 2021).

Embora nenhuma sinergia tenha sido encontrada entre as duas formulações comerciais avaliadas neste estudo, o grupo experimental IF obteve uma taxa de sobrevivência reduzida pela metade em comparação as abelhas expostas apenas ao fungicida, ainda que os indivíduos tenham recebido metade das doses dos dois agrotóxicos formulados.

As mudanças comportamentais alarmantes nas abelhas de IS durante o ensaio experimental foram evidenciadas nos dois períodos analisados. A hiperexcitação e a superestimulação registradas nos indivíduos expostos por 2 horas são esperadas devido ao mecanismo de ação da flupiradifurona sobre os nAChRs (Nauen *et al.*, 2015). Entretanto, após 4 horas, houve uma diminuição abrupta dessa atividade, representada pelos pontos destacados nas arenas (Fig. 3). Esses pontos bem definidos ocorreram devido aos efeitos colaterais observados no grupo experimental IS. Em ordem cronológica de eventos, os indivíduos

apresentaram sintomas resultantes dos efeitos neurotóxicos, como comprometimento de ambas as pernas traseiras, seguidas pela impossibilidade de retrain a probóscide e pela incapacidade de permanecer na posição ventral.

Esses dois padrões comportamentais e sintomas de envenenamento também foram observados no grupo experimental IF, demonstrando a predominância dos efeitos do inseticida na dieta. Tosi & Nieh (2017) descreveram sintomas semelhantes em *A. mellifera* após exposição a neonicotinoides, como tremores nas pernas e perda de coordenação motora evidenciada por tropeços frequentes, enfatizando seus efeitos neurotóxicos. Além disso, Farder-Gomes *et al.* (2024) também relataram atividade reduzida em *M. scutellaris* após exposição à piraclostrobina, incluindo redução da distância percorrida e da velocidade média.

As análises semiquantitativas das taxas de lesão no intestino médio e nos túbulos de Malpighi evidenciam que os efeitos subletais dos agrotóxicos avaliados ocorrem mesmo após curtas exposições, incluindo eliminação celular, secreção apócrina, esferocristais excessivos, vacuolização e picnose nuclear. Essas lesões foram semelhantes às observadas anteriormente no intestino médio e nos túbulos de Malpighi de *A. mellifera* africanizada após exposição à picoxistrobina, fungicida pertencente ao grupo das estrobilurinas (Batista *et al.*, 2020).

Considerando que apenas os grupos experimentais IS (2h e 4h) e IF apresentaram eliminação celular, o produto formulado à base de flupiradifurona pode promover disfunção celular (Billingsley & Lehane, 1996). Esse tipo de lesão é frequentemente observado em abelhas expostas a agrotóxicos, pois as células digestivas são as primeiras a ter contato com agentes externos nocivos (Caccia *et al.*, 2019). No entanto, a renovação celular ocorre por meio de ninhos de células que não foram danificadas durante os períodos de tempo avaliados para os tratamentos.

O aumento de esferocristais de abelhas expostas a agrotóxicos sugere acúmulo de minerais nas células, bem como resposta fisiológica de desintoxicação e osmorregulação dos órgãos, principais funções da estrutura (Cruz-Landim; Serrão, 1997). Os esferocristais também estavam presentes, em menos quantidade, em abelhas do controle, potencialmente indicando sua relação com a senescência dos indivíduos (Ryerse, 1979; Mutlu e Suludere, 2020). Este fator pode ser considerado relevante devido ao resultado da mortalidade de CL.

Em ambos os órgãos, a única lesão de nível 2 que apresentou ocorrência relevante foi a vacuolização, com p-valor significativo para todos os grupos experimentais expostos aos agrotóxicos nos túbulos de Malpighi e para o grupo IF no intestino médio. Segundo Carneiro *et al.* (2022), a presença de vacuolização pode indicar perda de material citoplasmático ou morte celular por autofagia. Além disso, a picnose nuclear encontrada nos grupos experimentais

também sugere o início do processo de morte celular, caracterizado pela condensação da cromatina e perda do conteúdo citoplasmático, sendo esta uma lesão irreversível (Grella *et al.*, 2019).

Embora essas lesões sejam consideradas naturais e um processo importante para os órgãos, os índices encontrados neste estudo, bem como as alterações morfológicas na histoarquitetura dos órgãos, sugerem que os indivíduos sofrem consequências metabólicas subletais devido à exposição oral aos agrotóxicos avaliados de forma isolada e combinada. Dessa forma, é importante ressaltar que este estudo teve como objetivo analisar os efeitos de dois produtos formulados que não possuem a identificação de seus ingredientes inertes associados, portanto correlacioná-los com os resultados aqui demonstrados em *M. scutellaris* torna-se inviável. Ainda, os resultados obtidos corroboram com estudos citados anteriormente e indicam que os produtos formulados respondem consistentemente seus respectivos i.a.

Considerando que o uso de agrotóxicos dobrou de 1990 a 2022 (FAO, 2024), as pesquisas atuais são limitadas para atender à demanda por compreensão de seus efeitos sob as abelhas, especialmente em espécies não-*Apis*. Portanto, com essas novas descobertas, pretendemos reduzir a lacuna de conhecimento sobre essa questão.

## 6. CONCLUSÃO

Os dados inéditos obtidos neste estudo demonstram que a exposição oral ao inseticida à base de flupiradifurona e ao fungicida à base de piraclostrobina e fluxapiroxade afetam negativamente a saúde de forrageiras de *M. scutellaris*. Esses produtos formulados, isolados ou combinados, mesmo por períodos de breve exposição podem causar danos irreparáveis ao comportamento e à morfofisiologia do intestino médio e dos túbulos de Malpighi, contribuindo para a mortalidade dos indivíduos. Considerando a biologia das abelhas e o tempo de desenvolvimento das abelhas nativas sem ferrão da espécie *M. scutellaris*, os produtos formulados avaliados podem comprometer a viabilidade geral da colônia.

Estes resultados evidenciam a importância de análises toxicológicas acerca de produtos formulados, bem como enriquecem a base de dados produzida pelo Laboratório de Ecotoxicologia e Conservação de Abelhas (LECA), que promove estudos utilizados em ferramentas como avaliação de risco.

## REFERÊNCIAS

A.B.E.L.H.A (Brasil). **Meliponini**. Disponível em: <https://abelha.org.br/meliponicultura/>. Acesso em: 10 dez. 2024.

AL NAGGAR, Yahya; BAER, Boris. Consequences of a short time exposure to a sublethal dose of Flupyradifurone (Sivanto) pesticide early in life on survival and immunity in the honeybee (*Apis mellifera*). **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 19753, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56224-1>

ASSIS, Josimere C. *et al.* Sublethal doses of imidacloprid and pyraclostrobin impair fat body of solitary bee *Tetrapedia diversipes* (Klug, 1810). **Environmental Pollution**, v. 304, p. 119140, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119140>

AVENOT, Hervé F.; MICHAILIDES, Themis J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. **Crop protection**, v. 29, n. 7, p. 643-651, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.02.019>

AZPIAZU, Celeste *et al.* Toxicity of the insecticide sulfoxaflor alone and in combination with the fungicide fluxapyroxad in three bee species. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 6821, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86036-1>

BARGAŃSKA, Żaneta; ŚLEBIODA, Marek; NAMIEŚNIK, Jacek. Honey bees and their products: bioindicators of environmental contamination. **Critical Reviews In Environmental Science And Technology**, v. 46, n. 3, p. 235-248, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/10643389.2015.1078220>.

BARTLETT, Dave W. *et al.* The strobilurin fungicides. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 58, n. 7, p. 649-662, 2002. <https://doi.org/10.1002/ps.520>

BATISTA, Ana C. *et al.* Is a strobilurin fungicide capable of inducing histopathological effects on the midgut and Malpighian tubules of honey bees?. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 834-843, 2020. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1724678>

BATISTA, Nathan Rodrigues *et al.* Effects of chronic exposure to sublethal doses of neonicotinoids in the social wasp *Polybia paulista*: Survival, mobility, and histopathology. **Science of The Total Environment**, v. 904, p. 166823, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166823>

BERNARDES, Rodrigo C. *et al.* Ethoflow: computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis. **Sensors**, v. 21, n. 9, p. 3237, 2021.

BERNARDES, Rodrigo C. *et al.* Impact of copper sulfate on survival, behavior, midgut morphology, and antioxidant activity of *Partamona helleri* (Apidae: Meliponini). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 4, p. 6294-6305, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16109-1>

BILLINGSLEY, P. F.; LEHANE, M. J. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: **Biology of the insect midgut**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1996. p. 3-30. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1519-0_1)

BERNET, D. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v. 22, n. 1, p. 25-34, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x>

BOYLE, Natalie K. *et al.* Workshop on pesticide exposure assessment paradigm for non-*Apis* bees: foundation and summaries. **Environmental entomology**, v. 48, n. 1, p. 4-11, 2019. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy103>.

BRASIL. IBAMA. **Agrotóxicos**. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos>. Acesso em: 10 dez. 2024.

BRASIL. IBAMA. **Seleção de espécies de abelhas nativas para avaliação de risco de agrotóxicos**. Brasília: 2018. Disponível em: [https://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/reavaliacao-ambiental/2018/Selecao\\_Especies\\_Abelhas\\_Nativas\\_para\\_Avaliacao\\_de\\_Risco\\_de\\_Agrotoxicos.pdf](https://www.ibama.gov.br/phocadownload/agrotoxicos/reavaliacao-ambiental/2018/Selecao_Especies_Abelhas_Nativas_para_Avaliacao_de_Risco_de_Agrotoxicos.pdf). Acesso em: 10 dez. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DAS RELAÇÕES EXTERIORES. **Geografia**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/mre/pt-br/embaixada-bogota/o-brasil/geografia>. Acesso em: 10 dez. 2024.

BUCHMANN, Stephen L.; HURLEY, James P. A biophysical model for buzz pollination in angiosperms. **Journal of Theoretical Biology**, v. 72, n. 4, p. 639-657, 1978. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(78\)90277-1](https://doi.org/10.1016/0022-5193(78)90277-1).

CACCIA, Silvia; CASARTELLI, Morena; TETTAMANTI, Gianluca. The amazing complexity of insect midgut cells: types, peculiarities, and functions. **Cell and Tissue research**, v. 377, p. 505-525, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03076-w>

CAMPBELL, Joshua W. *et al.* An evaluation of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) safety profile of a new systemic insecticide, flupyradifurone, under field conditions in Florida. **Journal of economic entomology**, v. 109, n. 5, p. 1967-1972, 2016. <https://doi.org/10.1093/jee/tow186>

CARDINAL, Sophie; BUCHMANN, Stephen L.; RUSSELL, Avery L. The evolution of floral sonication, a pollen foraging behavior used by bees (Anthophila). **Evolution**, v. 72, n. 3, p. 590-600, 2018. <https://doi.org/10.1111/evo.13446>

CARNEIRO, Lenise S. *et al.* Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. **Science of the Total Environment**, v. 815, p. 152847, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152847>

CATAE, Aline F. *et al.* Exposure to a sublethal concentration of imidacloprid and the side effects on target and nontarget organs of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Ecotoxicology**, v. 27, n. 2, p. 109-121, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1874-4>

CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press, 1998.

CRUZ LANDIM, Carminda. **Abelhas**. Unesp, 2009.

CUNNINGHAM, Morgan M. *et al.* Honey bees as biomonitors of environmental contaminants, pathogens, and climate change. **Ecological Indicators**, v. 134, p. 108457, 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108457>.

DECIO, Pâmela *et al.* Enzymatic responses in the head and midgut of Africanized *Apis mellifera* contaminated with a sublethal concentration of thiamethoxam. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 223, p. 112581, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112581>

DOLEZAL, Adam G. *et al.* Interacting stressors matter: diet quality and virus infection in honeybee health. **Royal Society open science**, v. 6, n. 2, p. 181803, 2019. <https://doi.org/10.1098/rsos.181803>

DOMINGUES, Caio E. C. *et al.* Fungicide pyraclostrobin affects midgut morphophysiology and reduces survival of Brazilian native stingless bee *Melipona scutellaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 206, p. 111395, 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111395>

DOMINGUES, Caio E. C. *et al.* Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees. **Environmental Pollution**, v. 266, p. 115267, 2020b. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115267>

DUAN, Xinle *et al.* Variation in the physiological response of adult worker bees of different ages (*Apis mellifera* L.) to pyraclostrobin stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 269, p. 115754, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.115754>

BRASIL. EMBRAPA. **Abelhas Nativas e Agroecologia**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/meio-ambiente/abelhas-nativas>. Acesso em: 10 dez. 2024.

FAO. *Pesticides use and trade – 1990–2022*, 2024. FAOSTAT Analytical Briefs, No. 89. Rome, 2024. <https://doi.org/10.4060/cd1486en>

FARDER-GOMES, Cliver F. *et al.* Exposure of the stingless bee *Melipona scutellaris* to imidacloprid, pyraclostrobin, and glyphosate, alone and in combination, impair its walking activity and fat body morphology and physiology. **Environmental Pollution**, v. 348, p. 123783, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123783>

FARDER-GOMES, Cliver F. *et al.* Exposure to sublethal concentrations of imidacloprid, pyraclostrobin, and glyphosate harm the behavior and fat body cells of the stingless bee *Scaptotrigona postica*. **Science of The Total Environment**, v. 907, p. 168072, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168072>

GIROTTI, Stefano *et al.* Bioindicators and biomonitoring: honeybees and hive products as pollution impact assessment tools for the mediterranean area. **Euro-Mediterranean Journal For Environmental Integration**, v. 5, n. 3, 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s41207-020-00204-9>.

GRELLA, Tatiane C. *et al.* Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. **Chemosphere**, v. 236, p. 124255, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.225>

GUO, Yi *et al.* The effects of exposure to flupyradifurone on survival, development, and foraging activity of honey bees (*Apis mellifera* L.) under field conditions. **Insects**, v. 12, n. 4, p. 357, 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12040357>

HRNCIR, Michael *et al.* The sound field generated by tethered stingless bees (*Melipona scutellaris*): inferences on its potential as a recruitment mechanism inside the hive. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 5, p. 686-698, 2008. <https://doi.org/10.1242/jeb.013938>.

INOUE, Lais V. B. *et al.* Harmful effects of pyraclostrobin on the fat body and pericardial cells of foragers of africanized honey bee. **Toxics**, v. 10, n. 9, p. 530, 2022. <https://doi.org/10.3390/toxics10090530>

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, v. 8, n. 3, 1983.

KALYABINA, Valeriya P. *et al.* Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health—a review. **Toxicology reports**, v. 8, p. 1179-1192, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.06.004>

KERR, W. E., Zilse, G. A. C., NASCIMENTO, V. A. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Fundação Acangau, Belo Horizonte, 1996.

KHALIFA, Shaden A. M. *et al.* Overview of bee pollination and its economic value for crop production. **Insects**, v. 12, n. 8, p. 688, 2021. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>

KLÁTYIK, Szandra *et al.* Authorization and toxicity of veterinary drugs and plant protection products: residues of the active ingredients in food and feed and toxicity problems related to adjuvants. **Frontiers in veterinary science**, v. 4, p. 146, 2017. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00146>

KOPIT, Andi M.; PITTS-SINGER, Theresa L. Routes of Pesticide Exposure in Solitary, Cavity-Nesting Bees. **Environmental Entomology**, v. 47, n. 3, p. 499-510, 2018. <https://dx.doi.org/10.1093/ee/nvy034>.

LOURENCETTI, Ana Paula S. *et al.* Surrogate species in pesticide risk assessments: Toxicological data of three stingless bees species. **Environmental Pollution**, v. 318, p. 120842, 2023.

MALASPINA, Osmar; SILVA-ZACARIN, Elaine Cristina Mathias. Cell markers for ecotoxicological studies in target organs of bees. **Journal of Morphological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 0-0, 2017.

Mapa (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Agrofit. 2020. Disponível em: [https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) . Acesso em: 2 out. 2024.

MICHENER, Charles D. **The bees of the world**. JHU press, 2007.

MIOTELO, Lucas *et al.* *Apis mellifera* and *Melipona scutellaris* exhibit differential sensitivity to thiamethoxam. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115770, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115770>

MUTLU, Damla A.; SULUDERE, Zekiye. The spherocrystals in the tubule epithelial cells and ultrastructure of the Malpighian tubules of adult *Isophya nervosa* (Orthoptera, Tettigoniidae). **Gazi University Journal of Science**, v. 33, n. 3, p. 630-644, 2020. <https://doi.org/10.35378/gujs.690948>

NAUEN, Ralf *et al.* Flupyradifurone: a brief profile of a new butenolide insecticide. **Pest management science**, v. 71, n. 6, p. 850-862, 2015. <https://doi.org/10.1002/ps.3932>

OECD. Test No. 213: honeybees, acute oral toxicity test. **OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2: effects on biotic systems**, 1998a. <https://doi.org/10.1787/9789264070165-en>

OECD, Test No. 245: Honey Bee (*Apis mellifera* L.), Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding), **OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2: effects on biotic systems**, 1998b. <https://doi.org/10.1787/9789264284081-en>.

OLIVEIRA, Cristiane R. *et al.* Nanopesticide based on botanical insecticide pyrethrum and its potential effects on honeybees. **Chemosphere**, v. 236, p. 124282, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.013>

PEDRO, Silvia RM. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348-354, 2014. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v61i4.348-354>.

PETTIS, Jeffery S. *et al.* Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *Nosema ceranae*. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e70182, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070182>

REAL-LUNA, Natalia *et al.* Las abejas sin aguijón (Tribu Meliponini) en los agroecosistemas de América Latina. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 13, n. 2, p. 331-344, 2022. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v13i2.2866>.

RONDEAU, Sabrina; RAINE, Nigel E. Fungicides and bees: a review of exposure and risk. **Environment International**, v. 165, p. 107311, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107311>

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

SALES, Victor Ribeiro *et al.* A systematic review of research conducted by pioneer groups in ecotoxicological studies with bees in Brazil: advances and perspectives. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 42, p. 62711-62732, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02633-y>

SERRA, Raissa Santana *et al.* The fungicide azoxystrobin causes histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Ecotoxicology**, v. 32, n. 2, p. 234-242, 2023. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02633-y>

SERRÃO, José E.; CRUZ-LANDIM, Carmina. Ultrastructure and histochemistry of the mineral concretions in the midgut of bees (Hymenoptera: Apidae) 1. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 47, n. 1, p. 21-29, 1996.

SILVA, Patrícia N.; HRNCIR, Michael; FONSECA, Vera Lúcia Imperatriz. A polinização por vibração. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 1, p. 140-151, 2010. <https://doi.org/10.4257/oeco.2010.1401.07>

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. Badajoz: Formatex Research Center**, p. 696-703, 2012.

SIVITER, Harry; MUTH, Felicity. Do novel insecticides pose a threat to beneficial insects?. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 287, n. 1935, p. 20201265, 2020. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1265>

TADEI, Rafaela *et al.* Late effect of larval co-exposure to the insecticide clothianidin and fungicide pyraclostrobin in Africanized *Apis mellifera*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 3277, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39383-z>

TOSI, Simone; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, alters honey bee activity, motor functions, and movement to light. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 15132, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15308-6>

TOSI, Simone *et al.* Long-term field-realistic exposure to a next-generation pesticide, flupyradifurone, impairs honey bee behaviour and survival. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 805, 2021. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02336-2>

TOSI, Simone *et al.* Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: a meta-analysis and new risk assessment tools. **Science Of The Total Environment**, v. 844, p. 156857, out. 2022. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156857>.

VALLEJO-MARÍN, Mario. How and why do bees buzz? Implications for buzz pollination. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 4, p. 1080-1092, 2022. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab428>