

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**Alicia Gallo De Mitri**

**POTENCIAIS EFEITOS DO INSETICIDA  
TIAMETOXAM EM ABELHAS FORRAGEIRAS  
DE *Apis mellifera***



Rio Claro - SP

2023

ALICIA GALLO DE MITRI

**POTENCIAIS EFEITOS DO INSETICIDA TIAMETOXAM EM  
ABELHAS FORRAGEIRAS DE *Apis mellifera***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientador: Osmar Malaspina

Coorientador: Annelise de Souza Rosa Fontana

Rio Claro - SP  
2023

M684p Mitri, Alicia De  
Potenciais efeitos do inseticida Tiametoxam em abelhas  
forrageiras de *Apis mellifera* / Alicia De Mitri. -- Rio Claro, 2023  
23 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura -  
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientador: Osmar Malaspina  
Coorientadora: Annelise Fontana

1. Abelhas. 2. *Apis mellifera*. 3. Inseticidas. 4. Ecotoxicologia.  
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.

ALICIA GALLO DE MITRI

**POTENCIAIS EFEITOS DO INSETICIDA TIAMETOXAM EM  
ABELHAS FORRAGEIRAS DE *Apis mellifera***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Osmar Malaspina


Profa. Dra. Annelise de Souza Rosa Fontana

Profa. Dra. Adna Suelen Dorigo

Profa. Dra. Tatiane Caroline Grella

Aprovado em: 15 de Junho de 2023

Documento assinado digitalmente  
 OSMAR MALASPINA  
Data: 04/07/2023 11:58:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
 ANNELISE DE SOUZA ROSA FONTANA  
Data: 04/07/2023 11:16:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura da orientanda

Assinatura do orientador

Assinatura da coorientadora

Rio Claro - SP

2023

*Ao Vô Gallo.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adriana e Giuseppe e à minha irmã, Aline, cuja lista de agradecimentos não caberia aqui Amo vocês por tudo que fizeram e fazem por mim sempre, e por terem me dado apoio em todos os momentos dessa caminhada, especialmente naqueles mais difíceis, mesmo com a distância física. Sem vocês, eu nunca teria chegado aonde cheguei. Muito obrigada!

Aos meus amados amigos de faculdade: Catarina, Gustavo, Hayen, Isabela, Iryna, Juliana, Murilo, Talita e tantos outros que torceram por mim e me apoiaram durante a graduação, além de me proporcionar muitas alegrias, mesmo que muitas vezes a distância. Seu incentivo foi extremamente importante e sem vocês, a conclusão desse ciclo teria sido muito mais difícil.

À Rafaela, por ter a maior paciência do mundo comigo, pelo incentivo diário físico e emocional, por estar sempre ali quando precisei e preciso, por me apoiar de diversas formas. A lista de agradecimentos não caberia aqui. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, especialmente naqueles mais difíceis.

À Profa. Dra. Annelise de Souza Rosa, por ter aceitado me orientar e pelos diversos ensinamentos importantes durante este projeto.

Ao Prof. Dr. Osmar Malaspina, pela receptividade em seu laboratório e por ter me permitido trabalhar no Centro de Estudos de Insetos Sociais. Agradeço também a todos os pesquisadoras e pesquisadores do CEIS pela ajuda e ensinamentos, principalmente a Profa. Dra. Tatiane Grella por todo o auxílio prático e teórico para que fosse possível a realização deste trabalho.

**“Science and everyday life cannot and should not be separated.”**

**- Rosalind Franklin**

## RESUMO

Abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) são os principais polinizadores de plantas cultivadas em todo o mundo. Entretanto, o uso de agrotóxicos tem acarretado grande declínio na população desses polinizadores em diversas áreas agrícolas. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os potenciais efeitos do inseticida Tiametoxam em abelhas forrageiras de *A. mellifera*, por meio da análise de dois parâmetros: taxa de mortalidade e potenciais alterações morfológicas nas células digestivas do intestino. As abelhas utilizadas foram coletadas de colônias localizadas no meliponário da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Rio Claro, SP. Foram monitoradas diariamente após a exposição de xarope contaminado com o inseticida com doses subletais da concentração de campo (Cc/1.000). No quinto dia, indivíduos do grupo controle e grupo exposto foram coletados para os processos de dissecação do intestino, com posterior coloração e avaliação morfológica do órgão. Através dos dados estatísticos finais, verificou-se que concentrações campo de Tiametoxam causaram as seguintes alterações no órgão: perda de material citoplasmático, perda de borda em escova, eliminação de células para o lúmen e presença de células com núcleos picnóticos. O inseticida afetou a sobrevivência e órgãos das abelhas testadas, ressaltando a importância do estudo para novas pesquisas e preservação das abelhas.

**Palavras-chave:** Células digestivas; Agrotóxicos; Hematoxilina-Eosina; Avaliação Morfológica.

## ABSTRACT

*Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) bees are the primary pollinators of cultivated plants worldwide. However, the use of pesticides has been leading to a significant decline in the population of these pollinators in various agricultural areas. In this context, this study aimed to evaluate the potential effects of the insecticide Thiamethoxam on foraging *A. mellifera* bees, through the analysis of two parameters: mortality rate and potential morphological changes in the digestive cells of the intestine. The bees used were collected from colonies located in the meliponary of the São Paulo State University (UNESP), campus Rio Claro, SP. They were monitored daily after the exposure of syrup contaminated with sublethal doses of the field concentration (Cc/1,000). On the fifth day, individuals from the control group and exposed group were collected for dissection of the intestine, with subsequent staining and morphological evaluation of the organ. Through the statistical data, it was found that field concentrations of Thiamethoxam caused the following alterations in the organ: loss of cytoplasmic material, loss of brush border, elimination of cells to the lumen, and presence of cells with pyknotic nuclei. The insecticide affected the survival and organs of the tested bees, highlighting the importance of the study for further research and preservation of bees.

**Keywords:** Digestive cells; Pesticides; Hematoxylin-Eosin; Morphological Evaluation.

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
3.1. Coleta de abelhas	12
3.2. Preparação do ingrediente ativo	12
3.3. Preparação para técnica histológica	12
3.4. Coloração Hematoxilina-Eosina	13
3.5. Análise morfológica	13
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>14</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>17</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>20</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>21</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies de polinizadores existentes destacam-se as abelhas, pois são fundamentais para garantir a manutenção de plantas cultiváveis e não cultiváveis, contribuindo com a diversidade genética das espécies e melhorando a qualidade dos frutos (GARIBALDI *et al.*, 2011; KLEIN *et al.*, 2007). A abelha *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) é uma das mais utilizadas para a polinização de plantas cultivadas em todo o mundo devido ao fácil manejo e tamanho de suas colmeias, como também pela eficiência e rapidez nesse processo em relação aos outros polinizadores (PIRES *et al.*, 2016; KLEIN *et al.*, 2020).

Devido a importância das abelhas para a polinização, existe a preocupação com o declínio de suas populações, causado por fatores como a fragmentação de habitats (POTTS *et al.*, 2010), mudanças climáticas (GIANNINI *et al.*, 2017), a pobreza nutricional (recursos monoflorais) (POTTS *et al.*, 2010), as doenças (causadas por vírus, ácaros ou microsporídios) (PIRES *et al.*, 2016), conseqüentemente levando a diminuição da imunidade da colônia e dos seus indivíduos, e o uso indiscriminado de agrotóxicos sistêmicos que contaminam o néctar e o pólen nos cultivos agrícolas e no entorno (por deriva em caso de pulverização) (GOULSON *et al.*, 2015).

O conhecimento dos danos causados por agentes tóxicos como os inseticidas aos organismos não alvo é de grande importância para o entendimento dos alvos e conseqüentemente das células-alvo, auxiliando assim no desenvolvimento de produtos menos tóxicos e ações de atenuação de riscos, especialmente para polinizadores. Os inseticidas podem ocasionar efeitos letais e subletais nas abelhas, afetando as campeiras no momento do forrageamento e até mesmo toda uma colônia, caso os resíduos sejam levados para dentro da colmeia (GOULSON *et al.*, 2015).

Considerando que as abelhas são organismos de extrema importância, tanto para a biodiversidade como para a economia agrícola, e os riscos a que estão expostas, devido ao uso de agrotóxicos sintéticos, novas formulações menos tóxicas aos seres vivos e ao meio ambiente vem sendo pesquisadas e desenvolvidas, buscando novas moléculas que são consideradas seguras para abelhas. A exemplo disso temos o Sulfoxaflor, do grupo das sulfonamidas, a Flupiradifurona (FPF), um

novo inseticida butenolídeo. Apesar disso, a molécula Tiametoxam, neonicotinóide de segunda geração, ainda é amplamente utilizada no Brasil.

Os neonicotinóides têm ação sistêmica, podendo ser aplicados tanto por via terrestre quanto aérea, sendo utilizado em diversas culturas, como: citros, café, cana-de-açúcar, arroz. Apesar de desenvolvido para ser relativamente seguro para as abelhas, principalmente para *A. mellifera*, há evidências crescentes de efeitos prejudiciais tais como comprometer a memória e o processo de aprendizado das abelhas, promovendo desorientação e prejudicando a coleta de recursos para a colmeia (MIOTELO *et al.*, 2022). Estudos como o de Tosi *et al.* (2017) apontaram que abelhas ingerindo doses de Tiametoxam relevantes para o campo acarretou diminuição da duração do vôo, distância e velocidade média após um ou dois dias. Tais mudanças podem levar a uma redução na expectativa de vida (Carvalho *et al.*, 2009), comprometimento da capacidade de voar (VANDAME *et al.*, 1995) e comprometimento da aprendizagem (EL HASSANI *et al.*, 2008), o que pode causar a interrupção, declínio e desaparecimento das abelhas (NEUMANN E CARRECK, 2010). Entretanto, ainda são escassas as informações sobre os efeitos subletais da Tiametoxam nas doses registradas para o manejo de pragas no Brasil.

Nos estudos ecotoxicológicos com abelhas, o intestino médio é um órgão amplamente utilizado no diagnóstico de efeitos celulares que os neonicotinóides podem causar em nível histológico. O epitélio intestinal é constituído por três tipos de células: as células digestivas, que são as mais abundantes e sintetizam as enzimas digestivas e os componentes da matriz peritrófica e absorvem nutrientes; células endócrinas, que se encontram em todo o intestino e produzem hormônios (Cruz-Landim *et al.*, 1996); e ninhos de células regenerativas, compostos por células indiferenciadas cuja função é substituir células desgastadas, que são enviadas para o lúmen. O epitélio do intestino forma importante barreira física e química contra os compostos potencialmente tóxicos ingeridos na sua alimentação, causando alterações nas funções de absorção e excreção do órgão (MIOTELO *et al.*, 2022). Em virtude das evidências citadas, a investigação de sua resposta à exposição a Tiametoxam se torna essencial para preenchermos as lacunas de informações sobre essa substância. )

## **2. OBJETIVO**

Avaliar os potenciais efeitos do inseticida Tiametoxam em abelhas forrageiras de *A. mellifera*, por meio da análise de dois parâmetros: taxa de mortalidade e potenciais alterações morfológicas do intestino.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Coleta de abelhas**

Foram coletadas vinte abelhas provenientes de três colônias diferentes, totalizando sessenta indivíduos, do meliponário da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, campus Rio Claro, SP, e foram separados em 10 indivíduos de cada colônia para o grupo controle e 10 indivíduos para o grupo exposto. As abelhas foram coletadas e mantidas em gaiolas experimentais, utilizando microtubos como alimentadores. O inseticida utilizado foi o Tiametoxam. As abelhas foram expostas à uma concentração subletal daquela recomendada para o uso em campo desta substância.

### **3.2. Preparação do ingrediente ativo**

A escolha da dose utilizada baseou-se nas bulas de produtos direcionados para cultivos atrativos para abelhas, recomendados e aprovados para uso segundo o Ministério da Agricultura. Os dados da bula foram plotados em uma planilha BeeREX para ser considerado o quanto de resíduos acabam indo parar no néctar das plantas e que serão posteriormente consumidos pelas abelhas. A solução mãe (1000 nanogramas de ingrediente ativo/ microlitro de água) foi diluída para a obtenção da concentração subletal de campo dividida por mil (Cc/1.000). Esse valor corresponde à concentração desejada de 0,00157 ng/ $\mu$ L de dieta, sendo então adicionada ao xarope e colocada em eppendorfs para que as abelhas pudessem alimentar-se. No grupo controle os eppendorfs possuíam apenas o xarope puro.

### **3.3. Preparação para técnica histológica**

Os indivíduos foram monitorados diariamente, sendo avaliada a taxa de mortalidade. No quinto dia, indivíduos foram coletados para os processos de

dissecação do intestino. O material foi fixado em paraformaldeído 4% por 24 horas e equilibrado em Tampão Fosfato de Sódio (PBS), pH 7,4 e 0,1M por 24 horas. Depois foi seguido o protocolo padrão para inclusão em historesina Leica. Após a inclusão, o material foi cortado em diferentes profundidades, tendo os cortes dispostos em lâminas e posteriormente passaram por coloração Hematoxilina-Eosina (HE).

### **3.4. Coloração Hematoxilina-Eosina**

As lâminas foram imersas em água destilada por 1 min, coradas com hematoxilina aquosa por 10 min, enxaguadas com água destilada por 5 min e lavadas em água corrente por 1 min. Após esses procedimentos, foram coradas com eosina por 5 minutos e lavadas novamente em água corrente por 1 minuto, seguindo o protocolo determinado por Junqueira e Junqueira (1983). Foram então secas e montadas com DPX, um meio de montagem permanente. Após a secagem das lâminas, os cortes foram analisados e fotografados em microscópio óptico com software *DP Controller* em aumento de 400x para obtenção de imagens. As imagens foram submetidas a análises no software *ImageJ*.

### **3.5. Análise morfológica**

Para as análises morfológicas do intestino, estabeleceram-se três níveis de importância, adaptados de Grella *et al.* (2019), onde os fatores de impacto foram determinados com base na relevância do dano patológico, de acordo com o quanto a lesão afetou a função do órgão, e a frequência em que ocorreu. As alterações foram classificadas em: grau 1 representa uma lesão menor, facilmente reversível; grau 2 representa um nível moderado, possivelmente reversível; e grau 3 representa uma lesão grave, geralmente irreversível e que pode levar a perda parcial ou total do órgão. A frequência variou de 0 a 6, onde 0 é uma ausência da ocorrência, 2 é uma ocorrência de baixa frequência, 4 é uma ocorrência de média frequência e 6 é uma ocorrência de alta frequência. Depois de completar as atribuições de pontuação para cada alteração, as pontuações foram multiplicadas pela frequência com que essa alteração estava presente no indivíduo.

#### 4. RESULTADOS

Observando os resultados da taxa de mortalidade (Tabela 1), podemos notar que as colônias expostas ao Tiametoxam tiveram resultado geralmente mais alto do que a taxa de mortalidade nas colônias de controle.

Tabela 1. Taxa de mortalidade observada de abelhas *A. mellifera* expostas ao Tiametoxam por via oral em três colônias diferentes. As taxas de mortalidade são apresentadas para o grupo controle (C) e o grupo exposto ao Tiametoxam (T) em cada colônia (C1, C2 e C3).

Grupos	C 1	C 2	C 3
<b>C</b>	100%	30%	80%
<b>T</b>	20%	100%	100%

Fonte: Dados da pesquisa.

Na colônia C1, o grupo de controle apresentou uma taxa de mortalidade de 100%, enquanto o grupo exposto ao Tiametoxam teve uma taxa de mortalidade de 20%. No grupo de controle, a colônia C2 apresentou a menor taxa de mortalidade, com apenas 30%. Já no grupo exposto ao Tiametoxam, as colônias C2 e C3 apresentaram a mesma taxa de mortalidade, de 100%.

Os resultados estatísticos obtidos demonstraram que a concentração subletal de campo dividida por mil de Tiametoxam foram capazes de induzir algumas alterações nas células intestinais das abelhas *A. mellifera* (Tabela 2).

Tabela 2. Análise estatística das alterações morfológicas observadas no intestino de *A. mellifera* exposta ao Tiametoxam, de forma oral. As letras representam: Grupo controle (C); grupo exposto a Tiametoxam (T); perda de material citoplasmático (pMC); perda de borda em escova (pBE); eliminação de células (EC); picnose (PIK) e perda de ninhos de células regenerativas (pNCR). Letras diferentes embaixo dos valores indicam diferenças estatísticas.  $p < 0,05$  para todas as análises.

Grupos	pMC	pBE	EC	PIK	pNCR
<b>C</b>	2.81 ± 0.41 a	5.83 ± 0.86 a	2.45 ± 0.36 a	2.52 ± 0.37 a	2.79 ± 0.41 b
<b>T</b>	2.25 ± 0.33 a	5.00 ± 0.74 a	2.54 ± 0.37 a	2.54 ± 0.37 a	5.42 ± 0.80 a

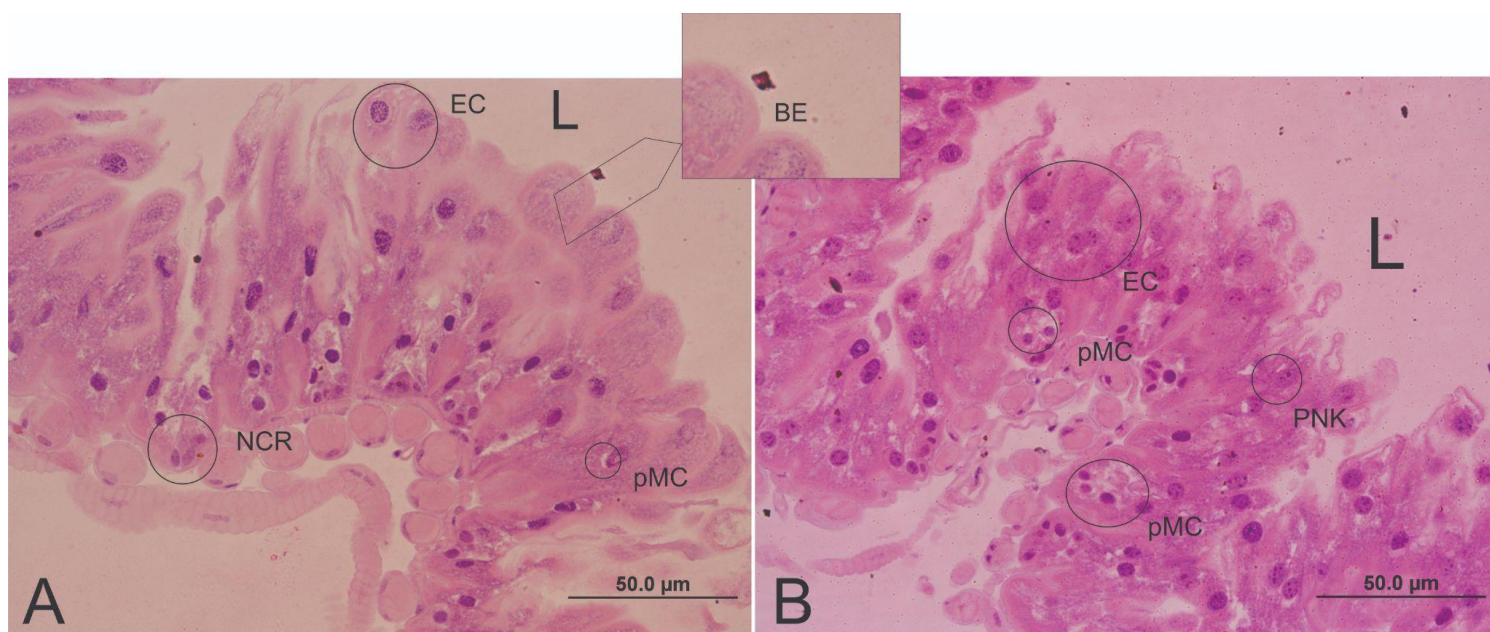
Fonte: Dados da pesquisa.

Com relação a perda de material citoplasmático, podemos observar que não houve diferença estatística entre os grupos controle e os grupos expostos (Figura 1). Esta perda está relacionada a diminuição do conteúdo que preenche o citoplasma das células. Este conteúdo inclui organelas, moléculas solúveis, como enzimas, proteínas, íons e outras que desempenham funções importantes na célula. O material também serve como um meio para as reações químicas celulares. Também não houve diferença estatística entre os grupos com relação a perda de borda em escova, importante para a absorção adequada de nutrientes e para a proteção das células epiteliais.

Em relação a eliminação de células não houve diferença estatística entre os grupos controle e grupo exposto ao Tiametoxam. Sobre a picnose, que é quando os núcleos das células ficam extremamente condensados e fortemente corados por hematoxilina (Figura 2), sendo um prelúdio da morte celular, pode-se observar que não houve uma diferença estatística significativa entre os grupos controle e exposto.

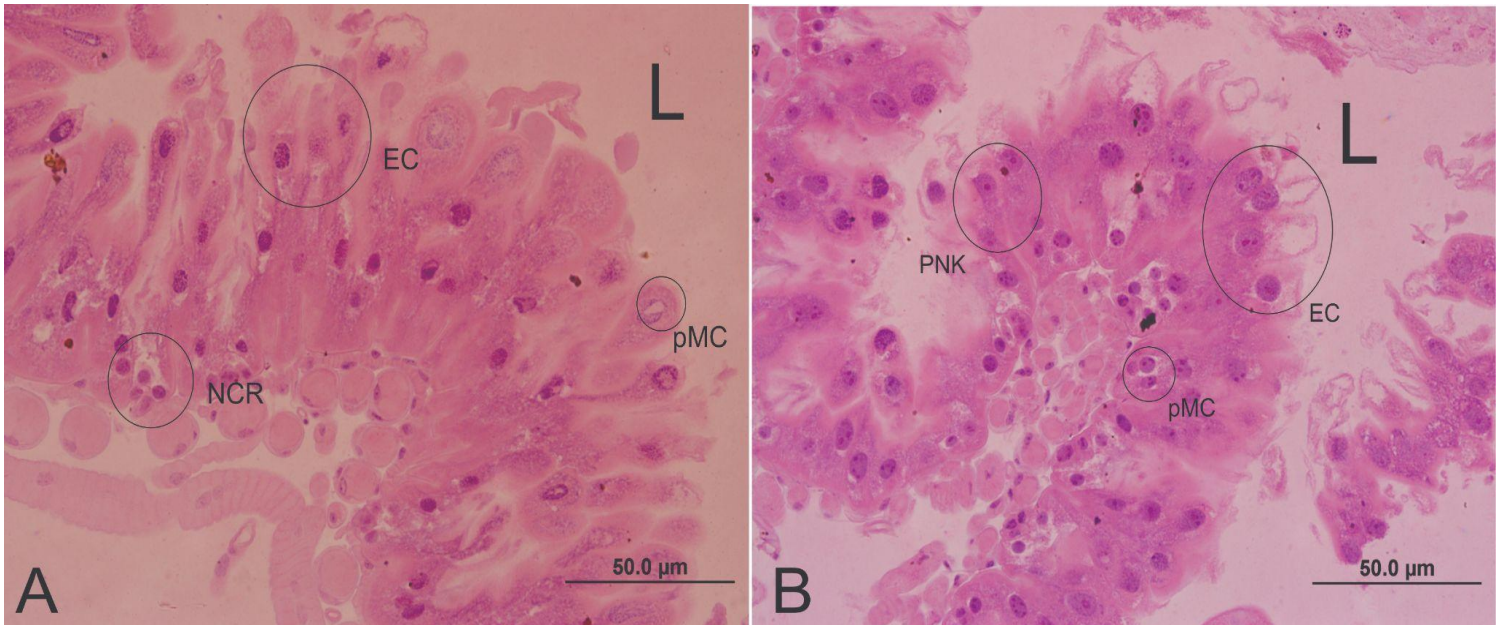
A perda de ninhos de células regenerativas, onde ocorre a diferenciação das células para substituir as células digestivas que sofreram algum dano, houve diferença estatística entre os grupos exposto e controle (Figura 3).

Figura 1 - Intestino médio de forrageiras de *A. mellifera*, corada com HE. As letras indicam: A - grupo controle; B - grupo exposto ao Tiametoxam; EC – eliminação de células; L – lúmen; NCR – ninho de células regenerativas; PNK – picnose; pMC - perda de material citoplasmático; BE - borda em escova. No canto direito, ampliação da imagem mostrando as bordas em escova das células.



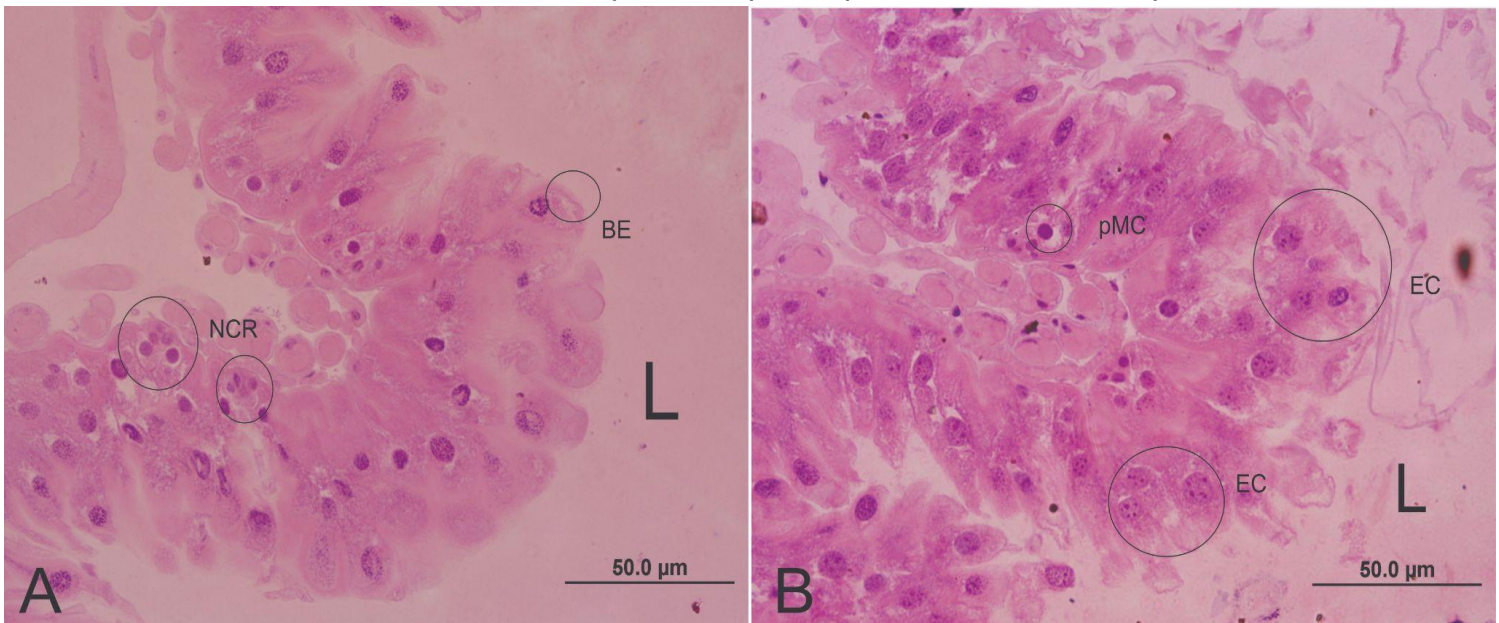
Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2 - Intestino médio de forrageiras de *A. mellifera*, corada com HE. As letras indicam: A - grupo controle; B - grupo exposto ao Tiametoxam; EC – eliminação de células; L – lúmen; NCR – ninho de células regenerativas; PNK – picnose; pMC - perda de material citoplasmático.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 3 - Intestino médio de forrageiras de *A. mellifera*, corada com HE. As letras indicam: A - grupo controle; B - grupo exposto ao Tiametoxam; EC – eliminação de células; L – lúmen; PNK – picnose; pMC - perda de material citoplasmático.



Fonte: Dados da pesquisa

## 5. DISCUSSÃO

Sobre a taxa de mortalidade, os resultados sugerem que a exposição ao Tiametoxam por via oral pode levar a altas taxas de mortalidade em abelhas *A. mellifera*, com variação nas taxas de mortalidade dependendo da colônia e do grupo de controle. Além disso, a colônia C1 parece ser menos suscetível ao Tiametoxam do que as outras colônias, por ter apresentado o menor índice de letalidade.

De acordo com os resultados do presente estudo, podemos observar que a concentração subletal de campo dividida por mil de Tiametoxam causa alterações morfológicas no intestino da abelha *A. mellifera*. Os *scores* estabelecidos por Grella *et al.*, (2019), nos possibilitou classificar o quanto severo é o dano no órgão e se é possível revertê-lo.

Uma das alterações analisadas foi a eliminação de células, mecanismo que é considerado natural do órgão, visto que as células digestivas apresentam um curto período de vida e são facilmente substituídas pelas células regenerativas (CRUZ-LANDIM, 2009), mas o aumento na frequência deste fenômeno é indicativo de estresse ao xenobiótico (BATISTA *et al.*, 2020; CASTRO *et al.*, 2020) A eliminação para o lúmen ocorre quando as células não são mais capazes de realizar sua função adequadamente, mas novas células são produzidas pelos ninhos de células regenerativas, repondo as células que foram eliminadas, a fim de não prejudicar o funcionamento do órgão (FARHAD *et al.*, 2008). Observando os dados estatísticos foi possível notar que não houve diferença estatística entre as abelhas expostas ao Tiametoxam e as abelhas do grupo controle.

Outra alteração observada foi a perda do material citoplasmático, fato que pode comprometer o funcionamento geral dos órgãos (Moore *et al.*, 2006). Quando ocorre a perda de material citoplasmático, pode haver uma redução na funcionalidade da célula ou até mesmo a morte celular. Por exemplo, se houver uma perda significativa de mitocôndrias, a célula pode não ser capaz de produzir energia suficiente para suas funções normais, o que pode levar a um estado de estresse celular e à morte celular. Além disso, a perda de proteínas essenciais ou enzimas pode afetar a capacidade da célula de realizar processos metabólicos e de defesa contra patógenos. Os agrotóxicos podem intensificar a perda do material citoplasmático nas células. Entretanto, não foi observada diferença estatística entre o experimento exposto e o controle com relação a este aspecto.

A principal função da borda em escova é aumentar a área de absorção e secreção da célula, permitindo uma troca mais eficiente de nutrientes, gases e outras substâncias com o ambiente ao redor (CRUZ-LANDIM, 2009). Essa estrutura também ajuda a proteger a superfície das células epiteliais contra danos e desgaste, atuando como uma barreira mecânica e reduzindo o atrito com outras células ou superfícies. Sabendo disso, a diminuição da espessura da borda em escova pode causar problemas ligados a absorção dos alimentos e no funcionamento correto do órgão. A perda de borda em escova foi outra alteração em que não ocorreu diferença estatística significativa quando se comparou o grupo exposto com o de controle.

Células com núcleo picnótico são aquelas em pré-estado de apoptose, um processo natural e programado para o indivíduo em sua fase de metamorfose (GREGORC *et al.*, 2004). Porém, quando existe a presença de um agrotóxico no órgão, a morte celular pode ocorrer em massa. Entretanto, células com núcleo picnótico foi uma alteração que não se verificou diferença estatística significativa quando comparada com ao controle.

Os ninhos de células regenerativas no intestino das abelhas têm a função de repor as células digestivas que não conseguem mais exercer sua função corretamente (CRUZ-LANDIM *et al.*, 1996). Logo, alteração nos ninhos pode acarretar no mau funcionamento do órgão no geral, tendo consequências irreversíveis principalmente na digestão e absorção de nutrientes (CRUZ-LANDIM, 2009). A perda de ninhos de células regenerativas no intestino foi uma alteração onde houve diferença estatística significativa quando comparada com ao controle. O mesmo foi observado nos estudos feitos por De Oliveira *et al.* (2013), que realizou um experimento com doses de tiametoxam diariamente e encontrou uma diminuição no número de células regenerativas progressivas. Essa diminuição na quantidade de ninhos é considerada uma lesão grave devido a perda da possibilidade de renovação celular, sendo assim, uma vez que os ninhos se diferenciam totalmente, as futuras células liberadas no lúmen não serão repostas, causando danos irreversíveis (GRELLA *et al.*, 2019).

De acordo com os resultados do presente estudo, podemos observar que concentrações 0,00157 ng/ $\mu$ L do agrotóxico Tiametoxam causam poucas alterações morfológicas no intestino das abelhas *A. mellifera* quando comparado com o grupo controle. Isso pode se dar pela concentração muito baixa oferecida de maneira oral

para as abelhas. Estudos como os de Sumida *et al.* (2010) e Cruz *et al.* (2010) salientam que uma dieta contaminada com doses altas em xenobióticos mostraram sinais de danos às células intestinais. No estudo de Jacob (2014) com abelhas *Scaptotrigona postica* expostas a Fipronil, indivíduos contaminados com as doses maiores morreram antes do fim do experimento.

Outro fator que podemos considerar é que durante períodos mais longos de exposição pode ocorrer “recuperação” das células afetadas. Em abelhas *A. mellifera* existem três famílias de enzimas que desempenham um papel na desintoxicação: GTSs, citocromo P450s e carboxilesterases (SCCs) (CLAUDIANOS *et al.*, 2006), o que atribui à essas abelhas um mecanismo de tolerância a inseticidas (JOHNSON, 2006). Este resultado foi visto por De Oliveira *et al.* (2013), onde casos de exposição contínua levaram o epitélio do intestino médio a ser incapaz de recuperar-se totalmente, e o dano reapareceu.

Os resultados do presente estudo sugerem que o Tiametoxam diminui a possibilidade de renovação do epitélio do intestino médio, pois com o dano nos ninhos de células regenerativas, o órgão não seria capaz de reestruturar-se constantemente, causando danos a longo prazo. A atenção para essa lesão se deve a grande presença de ninhos em processo de diferenciação e já totalmente diferenciados, pois demonstra intensa necessidade de renovação epitelial no intestino.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram avaliados os potenciais efeitos do inseticida Tiametoxam em abelhas forrageiras de *A. mellifera*. As abelhas foram expostas ao inseticida Tiametoxam sob doses concentração recomendada para o uso em campo. Para fins comparativos, foi também acompanhado um grupo de controle. Os resultados da taxa de mortalidade sugeriram que a exposição ao Tiametoxam por via oral pode levar a altas taxas, mas houveram variações entre as colônias estudadas. Já na análise morfológica da perda de material citoplasmático, perda de borda em escova, eliminação de células e picnose não apresentou diferença significativa entre o grupo exposto ao inseticida e grupo de controle. Entretanto, a avaliação da perda de ninhos de células regenerativas apresentou variações significativas entre os grupos, indicando alterações morfológicas prejudiciais ao intestino das abelhas, principalmente a longo prazo. Essas alterações morfológicas podem desencadear alterações fisiológicas no órgão e afetar a saúde dos indivíduos, comprometendo, posteriormente, a eficácia da polinização.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATISTA, A. 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.
- CARVALHO SM, CARVALHO GA, CARVALHO CF, BUENO FILHO JSS, BAPTISTA APM. **Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para abelha africanizada *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae).** Arq Inst Biol 76, p.597 – 606, 2009.
- CASTRO, M. D. A.; *et al.* **Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin.** Chemosphere, v. 248, 2020.
- CRUZ AS, SILVA-ZACARIN ECM, BUENO OC AND MALASPINA O. **Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae.** Cell Biol Toxicol 26, p.165 – 176, 2010.
- CRUZ-LANDIM, C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas.** São Paulo: Ed. UNESP. p.416, 2009.
- CRUZ-LANDIM, C.; *et al.* **Ultrastructural aspects of epithelial renewal in the midgut of adult worker bees (Hymenoptera, Apidae).** J. Comp. Biol. 1, p.29 - 40, 1996.
- CRUZ-LANDIM, C.; SERRÃO, J.; SILVA-DE-MORAES, R. L. M. **Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees.** Cytobios, v. 353, p.95-104, 1996.
- DE OLIVEIRA, R.A., Roat, T.C., Carvalho, S.M., Malaspina, O. **Side-Effects Of Thiamethoxam on the Brains and Midgut of the Africanized Honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae),** vol. 24. Wiley Period. Inc., p.296 - 303, 2013.
- L HASSANI AK, DACHER M, GARY V, LAMBIN M, GAUTHIER M, ARMENGAUD C. **Effects of sublethal doses of Acetamiprid and Thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*).** Arch Environ Con Tox 54, p.653 – 661, 2008.
- GARIBALDI, L. A.; *et al.* **Stability of pollination services decreases with isolation from natural areas despite honey bee visits.** Ecology Letters, v. 14, n. 10, p.1062 - 1072, 2011.
- GIANNINI, T. C.; *et al.* **Projected climate change threatens pollinators and crop production in Brazil.** PLOS ONE, v. 12, n. 8, p.1 - 13, 2017.
- GOULSON, D.; *et al.* **Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers.** Science, v. 347, n. 6229, p. 1435-1446, 2015.
- GREGORC, A; POGACNIK, A; BOWEN, I. D. **Cell death in honeybee (*Apis mellifera*) larvae treated with oxalic or formic acid.** Apidologie, Versailles, v. 35, p.453 – 460, 2004.
- GRELLA, T. C.; SOARES-LIMA, H. M.; MALASPINA, O.; NOCELLI, R. C. F. **Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: a toxicological approach.** Chemosphere, [S.L.], v. 236, p.124255, dez. 2019.

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

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.** Livraria e Editora Santos, São Paulo, 1ª ed. 123 p.1983.

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

FARHAD, Kakamand *et al.* **The role of three insecticides in disturbance the midgut tissue in honey bee *Apis Mellifera* L. workers.** J. Dohuk Univ., v. 11, ed. 1, p.144 - 151, 2008.

KLEIN, A.; *et al.* **Importance of pollinators in changing landscapes for world crops.** Proceedings Of The Royal Society: Biological Sciences, v. 274, n.1608, p.303 - 313, 2007.

KLEIN, A. M.; FREITAS, B. M.; BOMFIM, G. A.; BOREUX, V.; FORNOFF, F.; OLIVEIRA, M. O. A. **Polinização Agrícola por Insetos no Brasil.** Maranguape, Unifreiburg. 2020.

MIOTELO, L.; *et al.* **A food-ingested sublethal concentration of thiamethoxam has harmful effects on the stingless bee *Melipona scutellaris*.** Chemosphere, [s. l.], v. 288, 1 fev. 2022.

MOORE, M.N., ALLEN, J.I., SOMERFIELD, P.J.. **Autophagy:** role in surviving environmental stress. Mar. Environ. Res. 62, S420 - S425, 2006.

NEUMANN P, CARRECK N. **Honey bee colony losses.** J Apicult Res 49, p.1 – 6, 2010.

PIRES, C. S. S.; *et al.* **Enfraquecimento e perda de colônias de abelhas no Brasil: há casos de CCD?.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 51, n. 5, p.422 - 442, 2016.

POTTS, S. G.; *et al.* **Global pollinator declines:** trends, impacts and drivers. Trends In Ecology & Evolution, v. 25, n .6, p.345 - 353, 2010.

RO JACOB, Cynthia *et al.* **Impact of fipronil on the mushroom bodies of the stingless bee *Scaptotrigona postica*.** Pest Manag Sci, n. 71, p. 114 - 122, 30 abr. 2014.

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

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

SUMIDA S, SILVA-ZACARIN ECM, DECIO P, MALASPINA O, BUENO FC, BUENO OC. **Toxicological and histopathological effects of boric acid on *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae) workers.** J Econ Entomol 103, p.676 – 690, 2010.

TOSI, SIMONE *et al.* **A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability.** Nature: Scientific Report, p. 1 - 8, 26 abr. 2017.

VANDAME R, MELED M, COLIN M-E, BELZUNCES LP. **Alteration of homingflight in the honey bee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin.** Environ Toxicol Chem 14, p.855 – 860, 1995.