

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL**

**Clorfenapir: Avaliações ecotoxicológicas e morfofisiológicas na praga *Tuta absoluta*  
e na abelha polinizadora *Partamona helleri***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Serrão

Doutorando: Filipe Schitini Salgado

**Viçosa – MG**

**2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S164c  
2024 Salgado, Filipe Schitini, 1994-  
Clorfenapir: avaliações ecotoxicológicas e  
morfofisiológicas na praga *Tuta absoluta* e na abelha  
polinizadora *Partamona helleri* / Filipe Schitini Salgado. –  
Viçosa, MG, 2024.

1 tese eletrônica (69 f.): il. (algumas color.).

.  
Orientador: José Eduardo Serrão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.661>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Tomate - Doenças e pragas - Controle. 2. Clorfenapir  
(Inseticida) - Toxicologia. 3. *Tuta absoluta*. 4. *Partamona helleri*  
. I. Serrão, José Eduardo, 1965-. II. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.


CDD 22. ed. 632.9517

# FILIPPE SCHITINI SALGADO

## Clorfenapir: Avaliações ecotoxicológicas e morfofisiológicas na praga *Tuta absoluta* e na abelha polinizadora *Partamona helleri*

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*


Aprovada: 18 de julho de 2024

Documento assinado digitalmente  
 **FILIPPE SCHITINI SALGADO**  
Data: 10/10/2024 12:49:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Filipe Schitini Salgado

Autor

Documento assinado digitalmente  
 **JOSE EDUARDO SERRAO**  
Data: 09/10/2024 17:14:44-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

José Eduardo Serrão

Orientador

Dedico este trabalho à memória de Flávia Maria da Silva Carmo, que seu legado e grandeza floresçam sempre em nossos corações.

“No meio do inverno, descobri, finalmente, que existe em mim um invencível verão”

– Albert Camus

## **Agradecimentos**

No alicerce, agradeço primeiramente à minha mãe Christiane Schitini Salgado e meu pai João Carlos Figueiredo Salgado. Vocês são a base sólida da fundação ética em que fui concebido e criado.

A Giovanna dos Santos Pereira, por toda a ajuda, considerações, boa vontade, carinho, companheirismo e por todo o amor no transpassar de uma tormenta infinda até a calmaria de um porto ensolarado. Não teria chegado até aqui se não fosse você, obrigado por me devolver a vontade de sonhar e por não me deixar desistir, mesmo quando essa parecia ser a única opção possível, eu amo você profundamente.

Ao Diego Souza por todas as contribuições e pertinências na confecção deste trabalho.

À Lisbetd por todo apoio e contribuições para este trabalho.

Ao Matheus Tudor, por toda a simbiose e sensibilidade desde o momento em que começamos a jornada de sermos biólogos. Começamos e terminamos lado a lado. Palavras são vazias ao tentar agradecer toda a amizade.

Ao meu orientador, José Eduardo Serrão, pela ótima orientação, mas principalmente por ter sido aquele que reconheceu e possibilitou, dentre todos os meus defeitos e limitações, a possibilidade de um trabalho honesto e digno de um cientista. Vou ser sempre grato por todo esforço, em palavra e no acolhedor silêncio de seu entendimento.

À banca, por toda a dedicação e empenho em transformar este singelo trabalho em matéria relevante para as futuras gerações.

Aos meus colegas de laboratório, por cada café, por cada conversa, cada sorriso e pela edificação como pessoa e profissional

À minha irmã, Luíza Schitini Salgado, pelo amor, carinho e boas memórias.

Ao Marvin Saraiva Lelis Ribeiro, por toda a amizade e atenção ao longo destes 17 anos

A Daniela Guedes, por toda a amizade e companheirismo. Você é e sempre será uma das pessoas mais importantes da minha vida.

Ao Mateus Elias Rodrigues, pela amizade e companheirismo de sempre.

A todos meus amigos e amigas que não cabem em uma folha simples de rosto.

À cada um que contribuiu de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho e para minha formação como cientista.

À Universidade Federal de Viçosa, e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e estrutural, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, APQ-00856-19, APQ-02486-22) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 403986/2021-4, 303243/2022-8).

## RESUMO

Salgado, Filipe Schitini, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2024.

**Clorfenapir: Avaliações ecotoxicológicas e morfofisiológicas na praga *Tuta absoluta* e na abelha polinizadora *Partamona helleri*.** Orientador: José Eduardo Serrão.

O objetivo deste trabalho foi verificar a viabilidade do uso do inseticida clofernapir para o combate da praga *Tuta absoluta*, maior praga do tomateiro (*Solanum lycopersicum*) levando em consideração os efeitos ecotoxicológicos, letais, histológicos, comportamentais e fisiológicos não só na praga, mas também na abelha sem ferrão *Partamona helleri*, polinizador de espécies nativas e agrícolas e também de importância econômica para meliponicultores. Nossos resultados verificaram a toxicidade de clorfenapir tanto para a praga, quanto para a abelha, através de ensaios de concentração mortalidade, danos no epitélio do intestino médio, característicos de intoxicação grave por xenobióticos como vacuolização, dilatação celular, presença de fragmentos celulares, extrusão de material celular e perda de ninhos de células regenerativas. A histoquímica revelou desestruturação celular e perdas de reservas energéticas para a praga, mas não para a abelha. O bioensaio comportamental apontou estresse e agitação na abelha e os dados de respirometria verificaram que abelhas expostas ao pesticida apresentaram atividade respiratória diminuída, resultado esperado devido ao mecanismo de ação do pesticida, que atua como interruptor da cadeia transportadora de elétrons no processo de respiração celular. Devido aos graves danos encontrados no polinizador, e a grande persistência ambiental do inseticida, é necessário que seja reavaliada a utilização deste pesticida para controle da praga, mesmo sendo ele um dos poucos que tem se mostrado eficiente no seu controle.

Palavras chave: Abelhas sem ferrão. Ecotoxicologia. Efeitos subletais. Inseticida. Traça do tomateiro.

## ABSTRACT

Salgado, Filipe Schitini, D. Sc., Federal University of Viçosa, July 2024.  
**Chlorphenapyr: Ecotoxicological and morphophysiological evaluations on the pest *Tuta absoluta* and the pollinating bee *Partamona helleri*.** Advisor: José Eduardo Serrão.

The objective of this work was to verify the feasibility of using the insecticide clofentapyr to combat the *Tuta absoluta* pest, the most important pest of tomato (*Solanum lycopersicum*), taking into account the ecotoxicological, lethal, histological, behavioral and physiological effects not only on the pest, but also in the stingless bee *Partamona helleri*, a pollinator of native and agricultural species and also of economic importance for meliponists. Our results verified the toxicity of chlorfenapyr to both the pest and the bee, through concentration tests, mortality, damage to the midgut epithelium, characteristic of severe intoxication by xenobiotics such as vacuolation, cell swelling, presence of cell fragments, extrusion of cellular material and loss of regenerative cell nests. Histochemistry revealed cell disruption and loss of energy reserves for the pest, but not for the bee. The behavioral bioassay showed stress and agitation in the bee and the respirometry data verified that bees exposed to the pesticide showed reduced respiratory activity, an expected result due to the pesticide's mechanism of action, which acts as an interruptor of the electron transport chain in the process of cellular respiration. Due to the serious damage found to the pollinator, and the great environmental persistence of the insecticide, it is necessary to reevaluate the use of this pesticide to control the pest, even though it is one of the few that has proven to be efficient in its control.

Keywords: Ecotoxicology. Insecticide. Stingless bee. Sublethal effects. Tomato pinworm.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	11
CAPITULO 1: Toxicidade e histopatologia no intestino médio causados pelo inseticida clorfenapir na praga <i>Tuta absoluta</i> (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) .....	14
RESUMO .....	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1. Obtenção de <i>T. absoluta</i> .....	19
2.2. Bioensaio de concentração-mortalidade.....	20
2.3. Histopatologia .....	20
2.4. Histoquímica .....	21
2.5. Análise estatística.....	21
3. RESULTADOS .....	22
3.1. Bioensaio de concentração-mortalidade.....	22
3.2. Histopatologia do intestino médio.....	22
4. DISCUSSÃO .....	25
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
6. ANEXOS .....	36
RESUMO .....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1. Obtenção de <i>P. helleri</i> .....	43
2.2. Bioensaio de concentração-mortalidade.....	43
2.3. Histopatologia.....	44
2.4. Histoquímica .....	45
2.6. Bioensaio de comportamento .....	47
2.7. Respirimetria .....	47
2.8. Análises estatísticas.....	48
3. Resultados.....	49
3.1. Bioensaio de concentração-mortalidade.....	49
3.2. Histopatologia .....	49

3.3. Histoquímica .....	51
3.4. Índice de lesão .....	51
3.5. Bioensaio de comportamento .....	51
3.6. Respirometria .....	55
4. DISCUSSÃO .....	55
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
CONCLUSÃO FINAL .....	69

## INTRODUÇÃO GERAL

A intensa busca por produtividade e altos padrões agrícolas têm imposto um dilema socioeconômico entre a busca da rentabilidade e as graves ameaças ambientais e ecológicas enfrentadas com o uso de pesticidas (Schoonhoven, 2005; Pedigo *et al.*, 2021). O Brasil, é o país com o maior consumo de inseticidas no mundo inteiro (Lopes *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2019), e um dos maiores produtores de tomate do mundo (CONAB, 2023). O tomateiro é uma cultura sensível às pragas e é frequentemente ameaçada pela praga *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), fitófago conhecido pela devastação desta cultura e por amplo histórico de resistência à inseticidas (Silva *et al.*, 2016). Neste contexto e dado a sua toxicidade, estudos apontam o inseticida clorfenapir como uma alternativa viável no controle químico desta praga (Silva *et al.*, 2016). Entretanto, clorfenapir também se mostrou tóxico para abelhas melíferas (Costa *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018), polinizadores que tem mostrado acentuado declínio populacional nas últimas décadas, apresentando potencial risco ecotoxicológico quando empregado em culturas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade, os efeitos histopatológicos e histoquímicos na praga *Tuta absoluta* acarretados pelo inseticida clorfenapir, a fim de verificar o potencial de controle e a extensão dos danos no intestino médio desta praga, bem como, verificamos a toxicidade, efeitos histopatológicos, histoquímicos, comportamentais e fisiológicos na abelha sem ferrão *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera: Apidae) acarretados pelo clorfenapir, objetivando avaliar a segurança ambiental do uso deste inseticida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Compêndio de estudos Conab (Companhia nacional de abastecimento) V.9, 2023. ISSN:

2446-5860. Governo do Brasil.

Costa, E. M., Araujo, E. L., Maia, A. V., Silva, F. E., Bezerra, C. E., & Silva, J. G. (2014).

Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Apidologie*, 45, 34-44.

Lopes, I. S., Zonaro, L. D., Calvalcante, M., dos Santos, T. C., de Melo Silva, P., de

Oliveira Legendre, A., & Talmoni, J. L. B. (2018). Agrotóxicos: a ameaça de extinção das abelhas no Brasil. Júnior, LM, Stevens, D., Purini, SR de M.,Magnoni,

M. da GM, Vale, JMF do, Júnior, GAB, Filho, EFA, Silva, WTL da, & Figueiredo,

W. dos S.(Orgs.). Programa Educativo e Social JC na Escola: Ciência Alimentando o Brasil. São Paulo: Centro Paula Souza, 95-110.

Schoonhoven LM, Van Loon JJ, e Dicke, M. *Insect-plant biology*. Oxford University

Press on Demand (2005).

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., S.K. Kohli,

P., Yadav, A.S., Bali, R.D., Parihar, O.I., Dar, K., Singh, S., Jasrotia, P., Bakshi, M.,

Ramakrishnan, S., Kumar, R., Bhardwaj, & Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1, 1-16.

Silva, T. B. M., Silva, W. M., Campos, M. R., Silva, J. E., Ribeiro, L. M. S., & Siqueira,

H. A. A. (2016). Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera:

Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. *Crop Protection*, 79, 80-86.

Pedigo, L. P., Rice, M. E., & Krell, R. K. (2021). Entomology and pest management.

Waveland Press.

Wang, Z., Cang, T., Wu, S., Wang, X., Qi, P., Wang, X., & Zhao, X. (2018). Screening

for suitable chemical acaricides against two-spotted spider mites, *Tetranychus*

*urticae*, on greenhouse strawberries in China. *Ecotoxicology and environmental*

*safety*, 163, 63-68.

**CAPITULO 1: Toxicidade e histopatologia no intestino médio causados pelo inseticida clorfenapir na praga *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae)**

**RESUMO**

A preocupação com o desenvolvimento de resistência à pesticidas nas culturas agrícolas tem se tornado cada vez mais acentuada, sendo encontradas nos dias de hoje espécies de pragas resistentes a quase todos os pesticidas disponíveis comercialmente. A traça do tomateiro, *Tuta absoluta* é a praga mais danosa à essa cultura, podendo acarretar danos severos, incluindo perda total da plantação. Esta espécie apresenta alto grau de resistência aos inseticidas empregados ao longo do tempo, sendo cada vez mais difícil encontrar químicos com espectros de ação específicos que controlem a praga de forma eficiente. O objetivo foi avaliar os efeitos letais, subletais e histopatológicos do inseticida clorfenapir na traça do tomateiro através de exposição oral ao inseticida. Para tanto, foram estimadas as concentrações letais pelo teste de concentração/mortalidade, estabelecendo a CL<sub>50</sub>, utilizada para avaliar os danos histopatológicos causados no intestino médio. O clorfenapir se mostrou tóxico e eficaz no controle direto da praga, assim como os testes histopatológicos e histoquímicos detectaram danos permanentes ao intestino médio de *T. absoluta* associados a mecanismos de morte celular programada como apoptose e autofagia e também a morte dos micetócitos.

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das principais questões na agricultura moderna é a conciliação entre a produtividade e a sustentabilidade ambiental. Grande parte dos cultivares são alvo de pragas e doenças que diminuem a produtividade e a rentabilidade. Se não contidas, tais pragas podem devastar plantações inteiras e devido à sua grande capacidade de reprodução e dispersão podem também causar intenso impacto ecológico nas regiões adjacentes aos cultivares (Schoonhoven, 2005; Pedigo *et al.*, 2021). O manejo integrado de pragas (MIP) tem buscado fornecer uma solução eficiente e sustentável ao problema das espécies pragas e doenças em cultivares. O MIP consiste em um conjunto de estratégias que conciliam sete principais tipos de controle, sendo eles: o controle biológico (controle populacional da praga geralmente mediado por inimigos naturais da praga); cultural (rotação de culturas, seleção de variedades resistentes); físico (utilização de barreiras e armadilhas que impedem o acesso da praga à cultura); genético (uso de plantas geneticamente modificadas para resistência à praga ou pesticidas); comportamental (emprego de feromônios e substâncias químicas para alteração comportamental da praga ou de inimigos naturais); legal (regulamentação legislativa dos materiais e métodos empregados no MIP) e o químico, com a utilização sustentável de pesticidas no controle de espécies-praga e doenças, tomando como relevante os possíveis danos biológicos e ecológicos (Schoonhoven, 2005; Peterson *et al.*, 2018; Pedigo *et al.*, 2021).

O tomate (*Solanum lycopersicum* (Solanaceae)) é um cultivar de importância econômica, sendo a maior produção brasileira concentrada nos estados de Goiás, São

Paulo, Minas Gerais e Bahia (CONAB, 2023). O Brasil é responsável pela nona maior produção de tomates do mundo, com área de produção correspondente à 55.000 ha (CONAB, 2023). A constante busca pelo atendimento de padrões internacionais de qualidade e produtividade, tem feito do tomate, um dos frutos com o maior emprego de pesticidas para controle de pragas (CONAB, 2023).

Um dos maiores empecilhos na produção brasileira e mundial de tomate é a infestação pelo fitófago *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae). Esta espécie apresenta distribuição global e potencial invasor na maior parte dos continentes (Santana *et al.*, 2019), ocasionando danos econômicos severos, podendo levar à perda do cultivo em sua totalidade (Haji *et al.*, 1998). Devido ao comportamento minador das larvas de *T. absoluta*, que infiltram no tecido vegetal (mesófilo foliar, frutos e caule) e as tornam menos expostas à inseticidas de contato, o controle populacional em culturas através de inseticidas químicos é limitado (Haji *et al.*, 1998; Desneux *et al.*, 2010), além disto, esta espécie apresenta um histórico de desenvolvimento de resistência à pesticidas (Silva *et al.*, 2016). Na América do Sul, diferentes classes de inseticida foram utilizadas à exaustão, sendo o primeiro relato de resistência da larva à pesticidas, avaliado para abamectina, cartap, permetrina e metamidofos em populações de campo no ano 2000 (Silva *et al.*, 2016). Em 2011, foi reportado a resistência da larva aos indoxacarb, *Bacillus thurigiensis*, bifentrina e permetrina (Silva *et al.*, 2016). Posteriormente outros estudos mostraram resistência da larva ao espinosade, acarretando em resistência cruzada com espinotoram (revisão em Silva *et al.*, 2016). Atualmente, o uso concomitante de diamidas tem permitido o resgate de inseticidas utilizados previamente, como indoxacarb,

abamectina e cartap e também aberto o leque para novos inseticidas como é o caso de clorfenapir, visto que o emprego combinado de pesticidas de diferentes modos de ação sobrecarrega o sistema de detoxificação das larvas (Silva *et al.*, 2016; Guedes *et al.*, 2019).

Clorfenapir é um pró-inseticida pertencente a família química dos pirróis halogenados, de origem microbiana, principalmente advindo do gênero *Streptomyces*, metabolizado como um inseticida nas células do hospedeiro, quando em contato com oxidases nos corpos mitocondriais. Ao adentrar as células e se ligar às cristas mitocondriais, atua alterando o gradiente de prótons entre a membrana interna e externa, e desacoplando a fosforilação oxidativa por interrupção e inativação dos elementos da cadeia de transporte de elétrons, resultando na interrupção da produção de ATP, ocasionando déficit energético, causando disfunção celular e morte do organismo (IRAC, 2017; Huang *et al.*, 2023). Até o presente momento, clorfenapir tem se mostrado eficiente no controle das pragas agrícolas *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae), *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae), *Hellula undalis Fabricius* (Lepidoptera: Pyralidae), *Lipaphis erysimi* (Hemiptera: Aphididae), *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripae) e ácaros Tetranychidae (Huang *et al.*, 2023)

A fase larval de *T. absoluta* apresenta morfologia do intestino médio semelhante a outros Lepidoptera, com a presença de matriz peritrófica, estrutura quitinosa que exerce a funcionalidade de estruturação e barreira mecânica primária ao intestino médio, uma

monocamada de células epiteliais composta por células digestivas com função absorptiva e secretora, células caliciformes com a função primária de excretar no lúmen um muco protetor, células regenerativas com função repositiva e possivelmente micetócitos, estruturas que abrigam microorganismos simbiotes de diferentes táxons com funções digestivas associadas, além de borda estriada apical desenvolvida com função absorptiva e protetora para as células epiteliais digestivas (Dos Santos, 2015).

Os inseticidas em geral, apresentam mecanismos de ações localizados, e muitas vezes teciduais, expondo e danificando os locais por onde perpassam, seja ele o tegumento, no caso de aplicações tópicas, seja ele algum inseticida por ingestão, que tenha a principal forma de ação através da passagem pelo canal alimentar, sendo o dano majoritariamente causado no intestino médio dos insetos, local de contato e absorção direta do alimento contaminado pelo pesticida, sendo dados de natureza histopatológica importantes para avaliar a natureza celular, histológica e sistêmica dos danos deste pesticida, como já avaliado para *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Denecke *et al.*, 2018; Fiaz *et al.*, 2018; Dutra *et al.*, 2019; Santos Junior *et al.*, 2020).

Desta forma, alguns estudos (Gontijo *et al.*, 2013; Hanafy & El-Sayed., 2013; Silva *et al.*, 2016) apontam a importância e eficácia no emprego de clorfenapir para o controle de populações de *T. absoluta* em cultivares no campo, como no tomateiro, através de testes de concentração-mortalidade, entretanto, nenhuma informação sobre os efeitos do pesticida na histologia, e possíveis danos subletais neste organismo foram reportadas. Além disso, a mortalidade é o único efeito avaliado nos insetos, enquanto os efeitos

subletais mais evidentes em insetos, como comportamento alterado, reprodução e danos celulares e teciduais, são negligenciados. No entanto, a literatura evidencia que os efeitos subletais, inclusive aqueles advindos de danos na estrutura do intestino médio do intestino, podem reduzir severamente o desempenho de pragas, e também de possíveis agentes polinizadores e inimigos naturais de praga, seja por inibição alimentar, repelência, alterações comportamentais e reprodutivas (Schoonhoven, 2005; Desneux *et al.*, 2007; de Castro *et al.*, 2020; Carneiro *et al.*, 2020; da Silva *et al.*, 2020; Farder-Gomes *et al.*, 2021a; Farder-Gomes *et al.*, 2021b; Serra *et al.*, 2021).

O objetivo deste estudo foi testar a hipótese de toxicidade do inseticida clorfenapir à larvas de terceiro instar de *T. absoluta* expostas à diferentes concentrações do inseticida clorfenapir, verificando o grau de mortalidade e as possíveis alterações histopatológicas no intestino médio deste inseto.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção de *T. absoluta***

Larvas de terceiro instar de *T. absoluta* foram obtidas a partir de criações mantidas no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A criação foi mantida em gaiolas com temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12 horas de luz e umidade relativa de  $75 \pm 5\%$ , alimentadas com folhas de tomateiro (Galdino *et al.*, 2011). Os insetos utilizados no experimento foram prontamente submetidos aos tratamentos para evitar quaisquer interferências externas e temporais.

## **2.2. Bioensaio de concentração-mortalidade**

A eficácia do inseticida clorfenapir (Pirate ® BASF 240 g i.a. L<sup>-1</sup>) foi determinada calculando as concentrações letais CL<sub>25</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>75</sub> e CL<sub>90</sub> em condições de laboratório. Cinco diluições do pesticida foram ajustadas em uma solução de 1mL em água destilada: 1,2; 2,4; 6, 12 e 18 ppm (1%; 2%; 5%; 10% e 15% da dose máxima recomendada em campo, valores estes determinados previamente em experimento piloto). Para cada tratamento, foram retiradas as alíquotas da solução estoque e solubilizadas com água destilada. As cinco concentrações do pesticida e o controle contendo apenas água foram aplicadas em alíquotas de 1 mL em 0,25 g de folhas de tomateiro (aproximadamente uma folha de tomateiro) que ficaram disponíveis até o fim do experimento (Galdino *et al.*, 2011). O bioensaio foi conduzido em potes plásticos de 100 cm<sup>3</sup> cobertos com tampa de plástico crivada e algodão para manter a umidade, contendo 10 indivíduos de *T. absoluta* cada, com quatro réplicas, totalizando 40 indivíduos por tratamento (n=240), a mortalidade foi avaliada após 48h de experimento (Galdino *et al.*, 2011).

## **2.3. Histopatologia**

Vinte larvas de *T. absoluta* foram expostas à CL<sub>50</sub> do inseticida clorfenapir, estimada previamente no bioensaio de concentração-mortalidade. Após 48h de exposição, 10 larvas foram dissecadas em solução salina para insetos (NaCl 0.15M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,15 M) para retirada do intestino médio que foi transferido para a solução fixadora de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) por 12 h a 5° C. As outras 10 larvas foram decapitadas e transferidas inteiramente para o mesmo fixador.

As amostras de intestino médio e de larvas foram desidratadas em uma série de etanol graduada (70, 80, 90 e 95%), e infiltradas em historesina Leica (Leica Biosystems

Nussloch GmbH, Heildelberger, Alemanha) com metanol proporção 1:3 por sete dias. Posteriormente este processo foi repetido por mais 3 vezes, seguindo o mesmo intervalo de tempo de sete dias para cada troca, nas concentrações de historesina e metanol 1:1 e 3:1 e por fim, inclusão total em historesina pura. Após a polimerização da historesina, as amostras foram seccionadas a 3  $\mu\text{m}$  de espessura em Micrótomo RM2255. Dez lâminas (6 cortes em cada) foram confeccionadas para cada uma das vinte larvas. As secções foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas usando um microscópio de luz Leica DMLS (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha).

#### **2.4. Histoquímica**

Dez lâminas (6 cortes por lâmina) de intestino médio de cada um dos 20 indivíduos, foram submetidas aos testes histoquímicos de ácido periódico de Schiff (P.A.S.) (Bancroft & Gamble, 2008), para avaliação diferencial da distribuição de reservas de glicogênio celular, e ao teste de Mercúrio de Bromofenol, para detectar alterações nos padrões proteico-celulares nas amostras (Bancroft e Gamble, 2008).

#### **2.5. Análise estatística**

O bioensaio de concentração-mortalidade e as respectivas concentrações letais  $CL_{25}$ ,  $CL_{50}$ ,  $CL_{75}$  e  $CL_{90}$ , bem como os parâmetros estatísticos e limites de confiança foram determinadas por análise Probit baseados na concentração Probit-mortalidade usando o software R para Windows.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Bioensaio de concentração–mortalidade

A análise Probit revelou que o modelo de concentração-mortalidade foi adequado ( $\chi^2 = 7.5562$ , gl = 3, Intercepto = 1.039230,  $P > 0.05$ ) e permitiu a estimativa das concentrações letais de clorpenafir para *T. absoluta* após 48 h (Tabela 1).

**Tabela 1:** Concentrações letais de clorpenafir para larvas de terceiro instar de *Tuta absoluta* após 48h de exposição, obtidas pela análise Probit ( $\chi^2 = 7.5562$ , GL = 3,  $P > 0,05$ )

Concentração letal	Concentração estimada (ppm)	Intervalo de confiança a 95% (ppm)
CL <sub>5</sub>	0.69	0.03 - 1.6
CL <sub>10</sub>	1	0.08 - 2.08
CL <sub>15</sub>	1.29	0.15 - 2.49
CL <sub>20</sub>	1.57	0.24 – 2.9
CL <sub>25</sub>	1.87	0.36 – 3.33
CL <sub>50</sub>	3.72	1.61 – 6.75
CL <sub>75</sub>	7.42	4.28 – 22.56
CL <sub>90</sub>	13.80	7.42 – 93.38

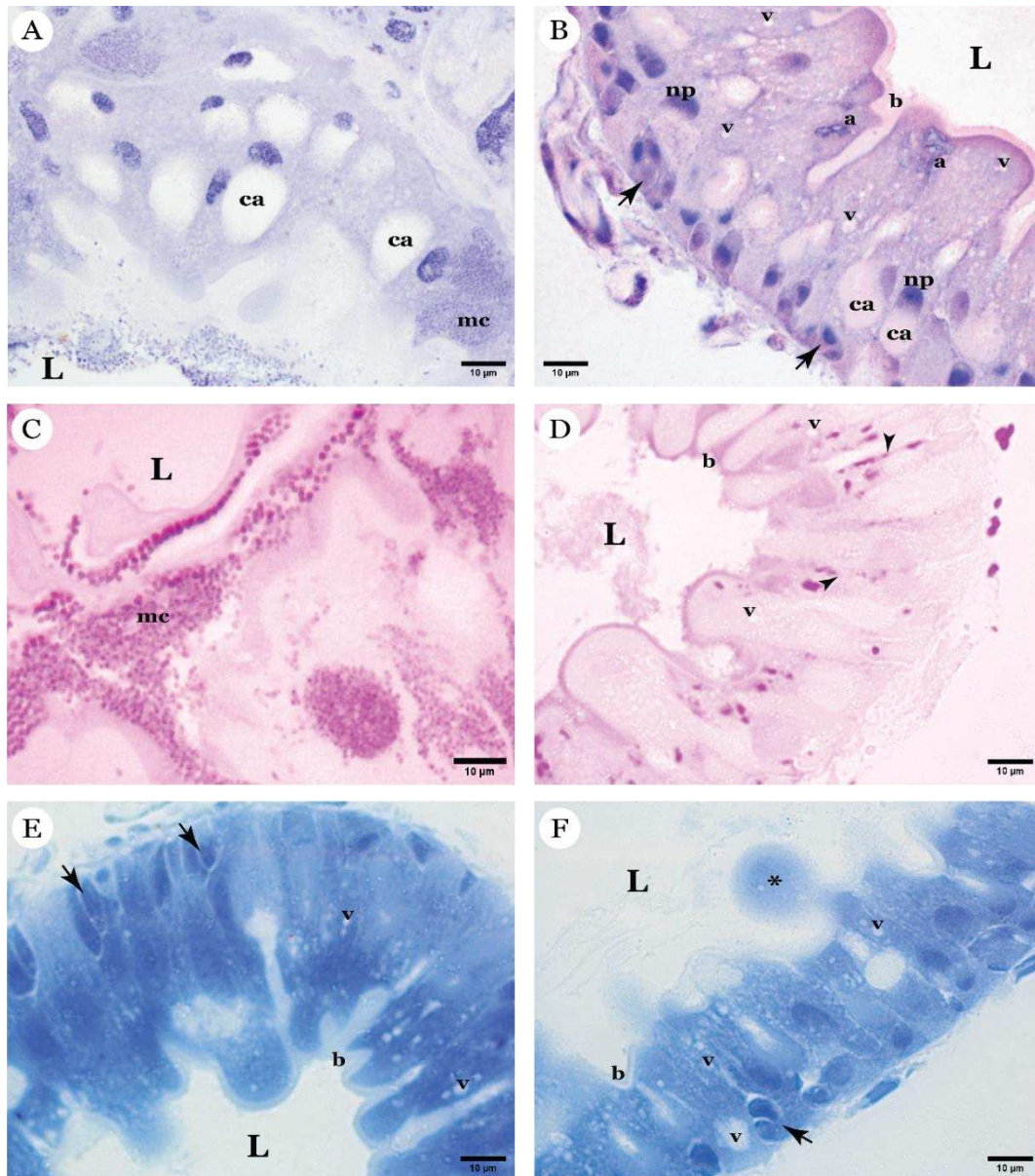
#### 3.2. Histopatologia do intestino médio

As larvas de *T. absoluta* do controle e do tratamento com a CL<sub>50</sub> apresentaram diferenças histopatológicas no intestino médio. O controle apresentou células caliciformes regulares e uma monocamada de células digestivas com aspecto semelhante ao pseudoestratificado com borda estriada espessa, núcleos com predomínio de cromatina descondensada e alguns vacúolos citoplasmáticos, além da presença de micetócitos (estruturas intracelulares que podem conter microbiota dos mais diversos táxons) (Figura 1A).

Os intestinos das larvas expostas a CL<sub>50</sub> de clorpenafir apresentaram células caliciformes com presença de conteúdo secretório, epitélio com borda estriada delgada, intensa vacuolização citoplasmática, extrusão do conteúdo celular e alto grau de condensação da cromatina com a presença de núcleos picnóticos e amorfos, não foram observados micetócitos (Figura 1B).

O teste para detecção de polissacarídeos neutros (P.A.S.) evidenciou reação diferencial entre os indivíduos do controle e do tratamento em termos de localização e intensidade. O controle apresentou fraca reação nas células epiteliais, forte reação nos micetócitos (Figura 1C). O intestino médio das larvas tratadas, apresentou acúmulo de glicoconjugados nas porções laterais das células digestivas, além de uma borda estriada menos espessa e a ausência dos micetócitos (Figura 1D).

A histoquímica para detecção de proteínas (mercúrio de bromofenol) apresentou polaridade no grupo controle, sendo o citoplasma apical e a borda estriada mais reativa (Figura 1E). Enquanto no tratamento ocorreu reação positiva uniforme nas células digestivas, com fraca reação na borda estriada e na extrusão de material celular (Figura 1F).



**Figura 1** – Micrografias de luz do intestino médio de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) em corte transversal. A coluna à esquerda representa o grupo controle e à direita o tratamento com a CL<sub>50</sub> de clorfenapir. A-B. Cortes corados com hematoxilina e eosina. Em A, há destaca-se a presença de células caliciformes (ca) e micetócitos (mc) próximos ao lúmen (L). Em B, observa-se vacúolos citoplasmáticos (v) e núcleos picnóticos (np) e amorfos (a), além de borda estriada delgada (b) e ninhos de células (seta) na base do epitélio, além de células caliciformes preenchidas por secreção. C-D. Cortes corados por P.A.S. No grupo controle há reação positiva nos micetócitos (mc) e borda estriada, enquanto no tratamento é possível notar reatividade nas regiões laterais das células epiteliais do intestino médio (ponta de seta). E-F. Cortes corados com mercúrio de bromofenol. Em E, nota-se uma certa polaridade na marcação, sendo a região apical apresentando maior positividade que a região basal. Em F evidencia-se numerosos vacúolos citoplasmáticos (v), extrusão do material celular (asterisco), além da fraca marcação das células e da borda estriada (b).

#### 4. DISCUSSÃO

O inseticida clorfenapir é tóxico para a população de *T. absoluta* exposta via ingestão oral, aplicado sobre o substrato alimentar, estimando mortalidade superior à 90% com a concentração do ingrediente ativo de 13.8 ppm (CL<sub>90</sub>). Este valor é aproximadamente nove vezes menor do que a concentração máxima da calda recomendada para uso em campo (120 ppm) e 4,5 vezes menor do que a mínima concentração da calda (60 ppm). Esta discrepância pode ser ocasionada devida à resistência média ao inseticida ser inferior nesta população, diferenças de exposição e fisiológicas advindas do tratamento em laboratório, ou mesmo pelo uso excessivo deste pesticida em campo. Experimentos em campo contendo populações advindas de diferentes estados brasileiros, estimaram a necessidade de quantidades maiores do pesticida para atingir as mesmas concentrações letais (Silva *et al.*, 2016) que as aqui encontradas, porém inferiores à recomendada em campo. Nossos dados corroboram a eficácia de clorfenapir no controle de populações de *T. absoluta* (Gontijo *et al.*, 2013; Hanafy & El-Sayed, 2013; Silva *et al.*, 2016). Apesar dos resultados promissores, é de importância o constante monitoramento da resistência à clorfenapir, não apenas nessa espécie, mas em outros lepidópteros para que seja rastreada as causas e correlações da resistência deste pesticida e outros empregados nas respectivas culturas.

Os dados histopatológicos evidenciaram contrastes entre o controle e o tratado com o pesticida, com alto grau de dano celular no tratado de CL<sub>50</sub>. O modo de ação do clorfenapir está relacionado a disfunção da atividade mitocondrial, processo chave na ativação e recrutamento de vias apoptóticas celulares, incluindo nos Lepidoptera (Huang *et al.*, 2013). De acordo com o esperado para exposição aguda desse órgão ao pesticida

pela via oral, é possível observar através dos nossos resultados, indicadores como extrusão de material celular, alto grau de condensação da cromatina nuclear, incluindo a presença de núcleos picnóticos, comumente relacionada à intensa atividade transcricional relativa a ativação de via de morte celular apoptótica em células epiteliais do intestino médio, assim como verificado na espécie de Lepidoptera *Spodoptera frugiperda* (Huang *et al.*, 2013) .

Nas larvas de *T. absoluta* expostas ao clorpenafir, é possível também verificar a evidência de outro mecanismo de morte celular, a autofagia, correlata à pronunciada presença de vacuolização celular encontrada no intestino médio destas larvas, assim como verificada em *S. frugiperda* (Xu *et al.*, 2017), reiterando o alto potencial citotóxico do inseticida.

Os bioensaios de histopatologia e histoquímica do intestino médio de larvas de *T. absoluta* expostas a CL<sub>50</sub> do clorpenafir evidenciam atrofia da borda estriada epitelial, um forte indicativo de dano celular e comprometimento da função digestiva no inseto, uma vez que esta estrutura magnifica a superfície apical das células digestivas do intestino médio, exercendo assim função absorptiva e também protetora no intestino médio de insetos (Chapman, 1998), efeito reportado em insetos, quando expostos à diferentes classes de xenobióticos (Denecke *et al.*, 2018).

Os micetócitos, presentes nas células do epitélio intestinal de *T. absoluta* podem abrigar microrganismos de diversos táxons, em sua maioria bactérias, como reportado neste inseto por Dos Santos *et al* (2015). Este trabalho apresenta a segunda observação destas estruturas em Lepidoptera, apesar da sua função ainda não ser claramente

estabelecidas nesta ordem, sendo desta forma, necessária a verificação em estudos posteriores, pois a microbiota pode ter função vital na detoxificação de pesticidas no intestino médio dos insetos (Siddiqui *et al.*, 2022). Considerando o histórico de resistência à pesticidas em *T. absoluta* (Silva *et al.*, 2016), somado à pressão de seleção exercida pelos pesticidas em pragas (Schoonhoven, 2005; Hawkins *et al.*, 2019), é possível que os micetócitos também estejam relacionados com a resistência à plethora de pesticidas empregados ao longo do tempo em *T. absoluta*, podendo ser parte integrante do processo de evolução de resistência à pesticidas. A ocorrência desta estrutura em outras ordens de insetos, como Isoptera, Hemiptera, Hymenoptera, Diptera, Coleoptera e Blattodea está intimamente ligada ao processo digestivo (Ishikawa, 2003), e desta forma, os micetócitos podem também exercer tais funções digestivas em *T. absoluta*, dado a sua localidade e a natureza simbiote que estes microrganismos exercem nestas outras ordens de insetos (Moran & Baumann, 2000; Dos Santos *et al.*, 2015). A ausência dos micetócitos no intestino médio de *T. absoluta* tratados com a CL<sub>50</sub> de clorpenafir, pode ser fruto de ação direta do inseticida, alterando o escopo da pressão seletiva de uma perspectiva ecológica individual, para uma perspectiva de comunidade ou até ecossistêmica (revisão em Siddiqui *et al.*, 2022). Dada a importância dos micetócitos na atividade digestiva, a observação da morte destas estruturas celulares e dos microrganismos ali contidos, evidencia mais um fator de diminuição da atividade digestiva do intestino médio neste inseto, sugerindo a possibilidade de comportamento anti-alimentar nos indivíduos sobreviventes e, portanto, maior grau de eficiência e proteção da cultura (Siddiqui *et al.*, 2022).

Os testes histoquímicos para glicoconjugados e proteínas sugerem disfunção e desestruturação celular causados no intestino de *T. absoluta* causados pelo clorpenafir. A menor reatividade ao P.A.S., indicando menor concentração de carboidratos nos insetos tratados, pode ser devido ao fato do inseticida interromper ou diminuir a atividade digestiva no intestino médio, semelhante ao encontrado em *S. frugiperda* tratadas com óleos essenciais de plantas do gênero *Piper* (Dutra *et al.*, 2019). A presença diferencial dos carboidratos, concentrados lateralmente nas células do epitélio das larvas expostas ao inseticida, pode estar relacionada à desorganização citoplasmática e do citoesqueleto, ou mesmo a alocação dos mesmos para órgãos detoxificadores, como o corpo gorduroso (Dutra *et al.*, 2019).

O teste com mercúrio de bromofenol evidenciou reação positiva para proteínas na região apical da célula no controle, enquanto nas larvas expostas ao clorpenafir ocorreu distribuição homogênea das proteínas, provavelmente devido à disfunção da atividade digestiva nas células epiteliais do intestino médio devido à toxicidade do composto. Ademais, verifica-se menor abundância de proteínas no tratado, sugerindo danos aos elementos proteicos do citoesqueleto, e, por conseguinte, evidente desestruturação da célula que pode culminar com a presença de extrusão de material celular (Serra *et al.*, 2023). Em contrapartida, a literatura carece de estudos histopatológicos em microlepidópteros, sendo este um dos primeiros estudos a destacar a histopatologia causada por pesticida no intestino médio de *T. absoluta*.

O clorfenapir é um pesticida de nova geração, fabricado com o intuito de ser eficiente no controle de pragas em diferentes culturas, sendo altamente aplicável naquelas onde *T.*

*absoluta* se encontra resistente aos inseticidas de geração anterior como abamectina e cartap (Silva *et al.*, 2016). Nosso estudo, somado à literatura (Hanafy & El-Sayed., 2013; Silva *et al.*, 2016), evidencia o clorfenapir como uma proposta de manejo químico possível desta praga, considerando a sua eficácia, sendo este também empregado no controle de *S. frugiperda* em cultura do milho, com baixa probabilidade de resistência cruzada com outros pesticidas (Kanno *et al.*, 2020). Dessa forma, clorfenapir é uma possível opção química no controle da traça-do-tomateiro.

Clorfenapir se mostrou letal as larvas de terceiro instar de *T. absoluta*, causando danos severos ao epitélio do intestino médio e eliminação de micetócitos ali contidos, reiterando a sua eficácia como um inseticida para controle desta praga.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bancroft, J.D. & Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histological techniques*. London, Churchill Livingstone.
- Bruckman, D.R. Campbell; Floral neighborhood influences pollinator assemblages and effective pollination in a native plant. *Oecologia*, 176 (2014), pp. 465-476.
- Carneiro, L. S., Martínez, L. C., Gonçalves, W. G., Santana, L. M., & Serrão, J. E. (2020). The fungicide iprodione affects midgut cells of non-target honey bee *Apis mellifera* workers. *Ecotoxicology and environmental safety*, 189, 109991.
- Chapman, R. F. (1998). *The insects: structure and function*. Cambridge university press.
- Compêndio de estudos Conab (Companhia nacional de abastecimento) V.9, 2023. ISSN: 2446-5860. Governo do Brasil.
- Costa, E. M., Araujo, E. L., Maia, A. V., Silva, F. E., Bezerra, C. E., & Silva, J. G. (2014). Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Apidologie*, 45, 34-44.
- de Castro, M. B. A., Martinez, L. C., Cossolin, J. F. S., Serra, R. S., & Serrão, J. E. (2020). Cytotoxic effects on the midgut, hypopharyngeal, glands and brain of *Apis mellifera* honey bee workers exposed to chronic concentrations of lambda-cyhalothrin. *Chemosphere*, 248, 126075.
- da Silva, I. M., Zanuncio, J. C., Brügger, B. P., Soares, M. A., Zanuncio, A. J. V., Wilcken, C. F., ... & Sedyama, C. S. (2020). Selectivity of the botanical compounds to the pollinators *Apis mellifera* and *Trigona hyalinata* (Hymenoptera: Apidae). *Scientific Reports*, 10(1), 1-8.

- Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., & Vontas, J. (2018) How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect biochemistry and molecular biology* 103, 22–35.
- Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology* 52:81–106
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K. A., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., ... & Urbaneja, A. (2010). Biological invasion of European tomato crops by *Tuta absoluta*: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of pest science*, 83, 197-215.
- Dos Santos, M. C., Junqueira, M. R., de Sá, V. M., Zanúncio, J. C., & Serrão, J. E. (2015). Effect of silicon on the morphology of the midgut and mandible of tomato leafminer *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae. *Invertebrate survival journal*, 12(1), 158-165.
- Dutra, K. A., Wanderley Teixeira, V., Cruz, G. S., Silva, C. T. S., D' Assunção, C. G., Ferreira, C. G. M., ... & Navarro, D. M. A. F. (2019). Morphological and immunohistochemical study of the midgut and fat body of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: noctuidae) treated with essential oils of the genus *Piper*. *Biotechnic & Histochemistry*, 94(7), 498-513.
- Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., de Oliveira, L. L., Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2021a). Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini). *Science of The Total Environment*, 794, 148678.

- Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2021b). Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). *Science of The Total Environment*, 774, 145679.
- Fiaz, M., Martínez, L. C., da Silva Costa, M., Cossolin, J. F. S., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., ... & Serrão, J. E. (2018). Squamocin induce histological and ultrastructural changes in the midgut cells of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 1-8.
- Galdino, T. V. D. S., Picanço, M. C., Morais, E. G. F. D., Silva, N. R., Silva, G. A. R. D., & Lopes, M. C. (2011). Bioassay method for toxicity studies of insecticide formulations to *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917). *Ciência e Agrotecnologia*, 35, 869-877.
- Guedes, R. N. C., Roditakis, E., Campos, M. R., Haddi, K., Bielza, P., Siqueira, H. A. A., & Nauen, R. (2019). Insecticide resistance in the tomato pinworm *Tuta absoluta*: patterns, spread, mechanisms, management and outlook. *Journal of Pest Science*, 92(4), 1329-1342.
- Gontijo, P. C., Picanço, M. C., Pereira, E. J. G., Martins, J. C., Chediak, M., & Guedes, R. N. C. (2013). Spatial and temporal variation in the control failure likelihood of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta*. *Annals of applied biology*, 162(1), 50-59.
- Haji, F. N. P.; Alencar, T. A.; Prezotti, L. 1998. Principais pragas do tomateiro e alternativas de controle. Petrolina: Embrapa- CPATSA, 51 p.

- Hanafy, H. E., & El-Sayed, W. (2013). Efficacy of bio-and chemical insecticides in the control of *Tuta absoluta* (Meyrick) and *Helicoverpa armigera* (Hubner) infesting tomato plants. *Australian Journal of Basic and Applied Science*, 7(2), 943-948.
- Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A., & Neve, P. (2019). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, 94(1), 135-155.
- Huang, J., Lv, C., Hu, M., & Zhong, G. (2013). The mitochondria-mediate apoptosis of Lepidopteran cells induced by azadirachtin. *PLoS One*, 8(3), e58499.
- Huang, P., Yan, X., Yu, B., He, X., Lu, L., & Ren, Y. (2023). A Comprehensive Review of the Current Knowledge of Chlorfenapyr: Synthesis, Mode of Action, Resistance, and Environmental Toxicology. *Molecules*, 28(22), 7673.
- IRAC. Comitê de Ação a Resistência a Inseticidas. Classificação do modo de ação: a chave do manejo de resistência. 2017. (IRAC. Edição do Poster, 6.1). Disponível em <<http://www.irc-online.org/documents/moastructures-poster-portuguese/>>.
- Ishikawa, H. (2003). Insect symbiosis: an introduction. *Insect symbiosis*, 1, 1-21.
- Kanno, R. H., Bolzan, A., Kaiser, I. S., Lira, E. C., Amaral, F. S., Guidolin, A. S., ... & Omoto, C. (2020). Low risk of resistance evolution of *Spodoptera frugiperda* to chlorfenapyr in Brazil. *Journal of Pest Science*, 93(1), 365-378.
- Moran NA, Baumann P. Bacteria endosymbionts in animals. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 270-275, 2000.
- Pedigo, L. P., Rice, M. E., & Krell, R. K. (2021). *Entomology and pest management*. Waveland Press.

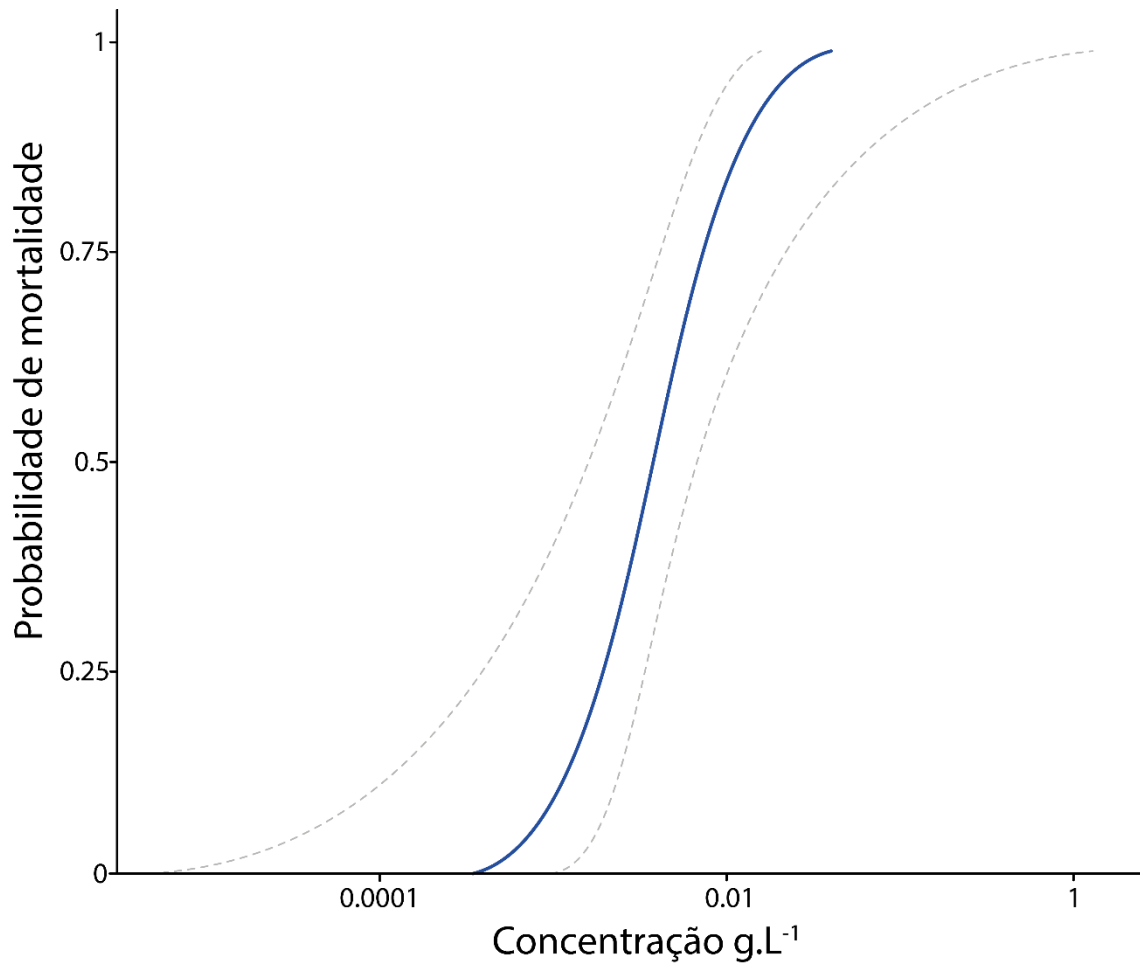
- Peterson, R. K., Higley, L. G., & Pedigo, L. P. (2018). Whatever happened to IPM? *American Entomologist*, 64(3), 146-150.
- Santana, P. A., Kumar, L., Da Silva, R. S., & Picanço, M. C. (2019). Global geographic distribution of *Tuta absoluta* as affected by climate change. *Journal of Pest Science*, 92, 1373-1385.
- Santos Junior, V.C.; Martínez, L.C.; Plata-Rueda, A.; Fernandes, F.L.; Tavares, W.S.; Zanuncio, J.C.; Serrão, J.E. (2020) Histopathological and cytotoxic changes induced by spinosad on midgut cells of the non-target predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere*, 238, 124585.
- Schoonhoven LM, Van Loon JJ, e Dicke, M. *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand (2005).
- Serra, R. S., Cossolin, J. F. S., de Resende, M. T. C. S., de Castro, M. A., Oliveira, A. H., Martínez, L. C., & Serrão, J. E. (2021). Spiromesifen induces histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honeybee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemosphere*, 270, 129439.
- Serra, R. S., Martínez, L. C., Cossolin, J. F. S., Resende, M. T. C. S. D., Carneiro, L. S., Fiaz, M., & Serrão, J. E. (2023). The fungicide azoxystrobin causes histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*, 32(2), 234-242.
- Siddiqui, J. A., Khan, M. M., Bamisile, B. S., Hafeez, M., Qasim, M., Rasheed, M. T., ... & Xu, Y. (2022). Role of insect gut microbiota in pesticide degradation: A review. *Frontiers in Microbiology*, 13, 870462.

- Silva, T. B. M., Silva, W. M., Campos, M. R., Silva, J. E., Ribeiro, L. M. S., & Siqueira, H. A. A. (2016). Susceptibility levels of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae) to minor classes of insecticides in Brazil. *Crop Protection*, 79, 80-86.
- Stefanini, M., Martino, C. D., & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216(5111), 173-174.
- Xu, Z., Lu, M., Yang, M., Xu, W., Gao, J., Zhang, Y., ... & Tao, L. (2017). Pyrethrum-extract induced autophagy in insect cells: A new target? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 137, 21-26.
- Wang, Z., Cang, T., Wu, S., Wang, X., Qi, P., Wang, X., & Zhao, X. (2018). Screening for suitable chemical acaricides against two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae*, on greenhouse strawberries in China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 163, 63-68.

## 6. ANEXOS

**Anexo 1:** Análise de concentração/mortalidade realizada através da análise Probit no software R! contendo todas as concentrações estimadas.

Probabilidade de morte	Concentração do pesticida (ppm)	Limite inferior (ppm)	Limite superior (ppm)
0.01	0.3443	0.005671	1.01
0.02	0.455	0.0114	1.21
0.03	0.5431	0.0178	1.36
0.04	0.6204	0.0248	1.49
0.05	0.6914	0.0325	1.6
0.06	0.7581	0.0408	1.71
0.07	0.8219	0.0499	1.81
0.08	0.8836	0.0597	1.9
0.09	0.9437	0.0702	1.99
0.10	1	0.0815	2.08
0.15	1.29	0.1504	2.49
0.20	1.57	0.243	2.9
0.25	1.87	0.3641	3.33
0.30	2.18	0.5193	3.8
0.35	2.51	0.7149	4.34
0.40	2.87	0.9574	4.97
0.45	3.27	1.25	5.75
0.50	3.72	1.61	6.75
0.55	4.23	2.02	8.07
0.60	4.82	2.49	9.9
0.65	5.52	3.02	12.53
0.70	6.36	3.61	16.44
0.75	7.42	4.28	22.56
0.80	8.8	5.07	32.76
0.85	10.74	6.06	51.64
0.90	13.8	7.42	93.38
0.91	14.66	7.77	108
0.92	15.66	8.17	126.59
0.93	16.83	8.63	150.86
0.94	18.25	9.15	183.69
0.95	20.01	9.78	230.18
0.96	22.3	10.57	300.39
0.97	25.47	11.6	417.34
0.98	30.4	13.11	647.47
0.99	40.18	15.83	1298.42



**Anexo 2:** Análise de concentração/mortalidade realizada através da análise Probit no software R! contendo todas as concentrações estimadas para este teste.

CAPITULO 2: TOXIDADE, HISTOPATOLOGIA DO INTESTINO MÉDIO, ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E RESPIROMÉTRICAS CAUSADAS PELO INSETICIDA CLORFENAPIR NA ABELHA SEM FERRÃO *PARTAMONA HELLERI* (FRIESE, 1900) (HYMENOPTERA:APIDAE)

**RESUMO**

As abelhas sem ferrão desempenham um papel crucial na polinização de diversas culturas agrícolas e na manutenção da biodiversidade. Nas últimas décadas tem sido registrada uma preocupante diminuição global das populações de abelhas, onde os pesticidas têm sido apontados como uma das causas chave. O Brasil, maior consumidor de pesticidas do mundo, abriga a espécie de abelha sem ferrão *Partamona helleri*, abelha de grande valor ecológico e agrícola. Este estudo investigou os efeitos do clorfenapir nesta abelha, estabelecendo as concentrações letais determinadas por bioensaios, revelando toxicidade para *P. helleri*. As análises histológicas do intestino médio das abelhas expostas ao clorfenapir mostraram vacuolização intensa, liberação de esferocristais no lúmen, perdas de ninhos de célula regenerativas e dilatação celular, indicando danos estruturais e funcionais irreversíveis. Além disso, o estudo avaliou as alterações comportamentais das abelhas expostas ao clorfenapir, registrando alto grau de estresse, através de aumento na distância percorrida e na velocidade média das abelhas, sugerindo efeitos subletais do pesticida. A respirometria indicou que as abelhas expostas ao clorfenapir apresentaram uma taxa de respiração reduzida, indicando interrupção do metabolismo energético desses polinizadores. Esses resultados destacam a sensibilidade de *P. helleri* ao clorfenapir e a necessidade de considerar os impactos ecológicos e econômicos dos pesticidas na conservação desses importantes polinizadores.

## 1. INTRODUÇÃO

Os serviços ecossistêmicos são definidos como atividades e funções ecológicas de importância e bem-estar para os seres humanos e a sociedade (Daily & Matson, 2008). São comumente exemplificados através do usufruto da diversidade genética dos ecossistemas florestais, fertilização de solo através da decomposição, mineralização de componentes orgânicos por microrganismos e da polinização de sistemas florestais naturais e de culturas de importância econômica por animais (Butler & Oluoch-Kosura, 2006; Fu *et al.*, 2013) Neste contexto, abelhas são polinizadores formidáveis, destacando-se a polinização mediada por abelhas do gênero *Apis* e aquelas por abelhas nativas, constituintes das comunidades e ecossistemas naturais (Matias *et al.*, 2017). Muito se discutiu sobre a importância e contribuição de abelhas nativas para a polinização de sistemas agrícolas, e cada vez mais estudos revelam o potencial e a importância dessas abelhas na mediação destes processos (revisão em Matias *et al.*, 2017).

As abelhas Meliponini, também conhecidas como abelhas sem ferrão, são generalistas de distribuição Pantropical, apresentam o maior número de espécies de abelhas eussociais, com 534 espécies descritas (Ascher & Pickering, 2022; Botina *et al.*, 2023). Essas abelhas são importantes fornecedoras de serviços ecossistêmicos, tendo como destaque a polinização, fundamentais para a manutenção da variabilidade genética de populações de espécies de plantas nativas, como também para a produtividade em sistemas agrícolas (Brown & Albrecht, 2001). Estima-se que os Meliponini podem ser responsáveis pela polinização de cerca de 40 a 90% da flora nativa, para além de culturas de importância econômica como acerola, goiaba, jabuticaba, macadâmia e pitanga (Kerr

*et al.*, 1996; Ferreira, 2011). Além disso, abelhas sem ferrão são empregadas em cultivos como agentes polinizadores visando o aumento de produtividade em culturas como café, cupuaçu, morango, girassol e tomate (Ferreira, 2011). Dentre os Meliponini, *Partamona helleri* (Friese, 1900) (Hymenoptera:Apidae) apresenta distribuição abrangente no Brasil, podendo ser encontrada do sudeste ao nordeste brasileiro (Pedro e Camargo, 2003), participando da polinização de diversas culturas, como eucalipto e limão (Carvalho *et al.*, 1999), além de serem usadas com frequência por meliponicultores brasileiros para a obtenção de mel e cera (Ferreira, 2011).

A viabilidade e diversidade de populações de abelhas estão em declínio nas últimas décadas em uma perspectiva global, apesar de ser discutido se as flutuações populacionais de *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera:Apidae) podem ser representativas e informativas sobre as populações de abelhas nativas (revisão em Wood *et al.*, 2020). As causas para este declínio ainda estão em estudo, mas algumas das hipóteses mais bem validadas, se respaldam no colapso por alterações climáticas, fragmentação de hábitat, introdução de espécies exóticas, parasitas, patógenos e intoxicação por pesticidas (Farde-Gomes *et al.*, 2021a; Warner *et al.*, 2023)

Dentre os agentes acima, os pesticidas têm sido utilizados comumente de forma não parcimoniosa, desrespeitando os limites de uso impostos legalmente, e assim contaminando recursos florais como néctar e pólen e, por conseguinte, intoxicando gravemente as abelhas (Lopes *et al.*, 2018). A principal via de contaminação dos polinizadores, por pesticidas, ocorre através da ingestão de pólen e néctar, os principais recursos florais explorados (Schoonhoven, 2005). Assim, o intestino médio dos insetos,

que desempenha o papel crucial na digestão e absorção de nutrientes, é um possível órgão a ser afetado pelos pesticidas (Denecke et al. 2018).

O intestino médio dos insetos é revestido por uma camada de células cúbicas ou colunares, cuja superfície apical é caracterizada pela presença de microvilosidades, as células digestivas, responsáveis pela secreção de enzimas digestivas e pela absorção de nutrientes, além de algumas células enteroendócrinas, especializadas na síntese de hormônios, e as células regenerativas, localizadas em ninhos na base do epitélio (Chapman, 1998; Cruz-Landim, 2009). O lúmen do órgão é revestido por camadas semipermeáveis acelulares, formando a matriz peritrófica, que auxilia na concentração de nutrientes e protege o epitélio contra danos mecânicos, patogênicos e químicos (Cruz-Landim, 2009; Jin *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2019).

A busca de padrões de qualidade cada vez maiores na agricultura, visando atender a exigente demanda do consumidor, estabelece um novo paradigma, onde é cada vez mais frequente e intensivo o uso de pesticidas, sendo o Brasil o maior utilizador de inseticidas em todo o mundo (Lopes *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2019). Estes pesticidas buscam controlar pragas, e acabam expondo e intoxicando organismos não-alvos como os polinizadores podendo levar à danos ecológicos e econômicos. Neste contexto, o tomate [*Solanum lycopersicum* (Solanaceae)], importante disponibilizador de recursos florais para *P. helleri* (Botina *et al.*, 2023), é um dos cultivares de maior importância no Brasil e no mundo, onde cada vez mais se empregam pesticidas, colocando em risco populações de polinizadores na cultura e em suas regiões adjacentes.

No Brasil e na América do Sul, diferentes classes de inseticidas foram empregadas na cultura do tomateiro, como abamectina, cartap, permetrina e metamidofos em populações de campo no ano 2000 para o controle da traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae), fitófago praga responsável por perdas econômicas nessa cultura (Silva *et al.*, 2016). Devido ao histórico de resistência desta praga a inseticidas, há uma constante busca por novos compostos que possam levar ao seu controle populacional de forma eficaz, neste contexto clorfenapir tornou-se um pesticida de uso frequente na cultura do tomateiro (Silva *et al.*, 2016). Clorfenapir é um pró-inseticida pertencente à família química dos pirróis halogenados, metabolizado como um inseticida nas células do hospedeiro quando em contato com enzimas oxidases, encontradas nas mitocôndrias, ligando-se às cristas mitocondriais, alterando o gradiente de prótons entre as membranas interna e externa, desacoplando a fosforilação oxidativa por interrupção e inativação dos elementos da cadeia de transporte de elétrons, resultando na interrupção da produção de ATP, impedindo a respiração celular, levando a morte (IRAC, 2017; Huang *et al.*, 2023).

O clorfenapir está proibido para uso cultural nos Estados Unidos da América e na Europa por apresentar alta persistência ambiental e risco ecotoxicológico para vida silvestre (Chen *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2023), colocando em risco populações de polinizadores, se apresentando como um potencial risco ecológico e cultural, visto que estudos prévios verificaram a toxicidade de clorfenapir para *A. mellifera* no Brasil (Costa *et al.*, 2014) e China (Wang *et al.*, 2018). Estes estudos indicaram diminuição da atividade motora e intoxicação seguida de morte, apesar de não ter sido elucidada a extensão e o

mecanismo de morte nas abelhas. Dado a similaridade fisiológica, comportamental e a proximidade filogenética entre as abelhas melíferas e as abelhas sem ferrão, é razoável esperar que o clorfenapir possa levar a alterações comportamentais, prejudicando o funcionamento da colônia como um todo, morte e possivelmente colapso da colônia.

O objetivo deste trabalho foi verificar a hipótese que o clorfenapir é tóxico para *P. helleri*. Especificamente foram analisadas a toxicidade, efeitos subletais na histopatologia e histoquímica do intestino médio, alterações comportamentais e fisiológicas na taxa de respiração.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Obtenção de *P. helleri***

Operárias adultas de *P. helleri* foram coletadas a partir de quatro diferentes colônias mantidas no Apiário Cental da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais (20°45'N; 42°52'W), Brasil. As forrageiras foram coletadas em frascos do tipo Erlenmeyer de um litro colocados na entrada dos seus ninhos, após leve perturbação mecânica nas colônias, estímulo necessário para ativar o reflexo de defesa da colônia. No laboratório as abelhas foram anestesiadas com CO<sub>2</sub> por no máximo cinco segundos, sendo transferidas para potes plásticos de 500 mL e aclimatados em a 28 ± 1 °C e umidade relativa de 75 ± 5% no escuro (Botina *et al.*, 2020). As abelhas foram deixadas em jejum por uma hora antes de serem submetidas aos experimentos (Botina *et al.*, 2020).

### **2.2. Bioensaio de concentração-mortalidade**

A toxicidade do inseticida clorfenapir (Pirate ® BASF 240 g i.a. L<sup>-1</sup>) foi determinada calculando as concentrações letais em exposição aguda de 24 horas, em condições de

laboratório. Cinco diluições do pesticida foram ajustadas em solução aquosa de sacarose de 1,5 ml (50% peso/peso) em microtubos: 0,3; 0,6; 1,2, 2,4 e 6 ppm, correspondendo a 0,25%; 0,5%; 1%; 2% e 5% da dose máxima recomendada em campo para controle de *T. absoluta*. Como controle foi usada solução aquosa de sacarose a 50%. Após uma hora de jejum, os microtubos contendo os cinco tratamentos e o controle foram colocados à disposição das abelhas para alimentação por três horas. Após as três horas de exposição ao tratamento/controle, todos os microtubos foram substituídos por outros contendo apenas 1,5 ml de solução de sacarose 50% por mais 24 horas, completando o experimento. O bioensaio foi conduzido em potes plásticos de 100 cm<sup>3</sup> cobertos com tampa de plástico perfurada e papel filtro na base, contendo 10 indivíduos de *P. helleri* cada, com quatro réplicas (uma para cada uma das quatro colônias), totalizando 40 indivíduos por tratamento, sendo utilizadas 240 abelhas no total. A mortalidade foi avaliada após as 24h de experimento, de acordo com Botina *et al.* (2020).

### **2.3. Histopatologia**

Cinco operárias forrageadoras adultas expostas ao controle e cinco expostas ao tratamento de CL<sub>50</sub> (definido no bioensaio de concentração-mortalidade) foram coletadas, crioanestesiadas a -5 °C por 5 minutos e dissecadas em solução salina para insetos (NaCl 0.15M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.15M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,15 M) para retirada do intestino médio que foi transferido para a solução fixadora de Zamboni (Stefanini *et al.*, 1967) por 48 h a 5° C. As amostras de intestino médio foram desidratadas em uma série crescente de etanol (70, 80, 90 e 95%), e incluídas em historesina Leica (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberger, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Após a

polimerização da historesina, as amostras foram seccionadas a 3 µm de espessura em Micrótomo RM2255 (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Heidelberger, Alemanha). As secções foram coradas com hematoxilina e eosina e analisadas usando microscópio de luz Leica DMLS (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha).

## **2.4. Histoquímica**

Algumas secções histológicas não coradas, obtidas como descrito acima, foram submetidas aos testes histoquímicos descritos a seguir, sendo analisada em microscópio de luz transmitida Olympus BX 53.

### **2.4.1. Detecção de Polissacarídeos neutros e glicoconjugados (P.A.S.)**

As secções histológicas foram incubadas em ácido periódico 0,4% por 30 min, lavadas rapidamente em água destilada e transferidas para reativo de Schiff por 1 h no escuro. Por fim, foram lavadas em água corrente por 30 min, montadas e analisadas (Bancroft e Gamble, 2008).

### **2.4.2. Detecção de Proteínas (mercúrio de bromofenol)**

As secções foram incubadas em mercúrio de bromofenol (100 mL de ácido acético 2%; 0,05 g de azul de bromofenol; 1,5 g de cloreto de mercúrio II) por 2 h e 15 min, lavadas com ácido acético 0,5% por 10 min e em água corrente por 15 min, montadas e analisadas (Bancroft e Gamble, 2008).

### **2.4.3. Quantificação da Intensidade de Reações Histoquímicas**

Dez imagens obtidas em um fotomicroscópio Olympus BX53, com objetiva de 40X e 0,75 de abertura numérica de cada intestino médio foram aleatoriamente selecionadas para cada técnica histoquímica para quantificar carboidratos e proteínas.

Utilizando o software ImageJ/FIJI, áreas de 64 x 64 pixels foram usadas para avaliar os valores de intensidade de pixel em escala de cinza (Urstadt 2022) em cinco regiões do epitélio escolhidas aleatoriamente.

## **2.5. Índice de lesão de órgãos**

Dez cortes histológicos por intestino médio corados com hematoxilina e eosina foram selecionados aleatoriamente e fotografados em fotomicroscópio Olympus BX53, com objetiva de 40X, abertura numérica de 0,75, para avaliação do índice de lesão do órgão (Bernet *et al.* 1999; Grella *et al.*, 2019; Domingues *et al.*, 2020) causado pelo clorfenapir seguindo a exposição de CL<sub>50</sub>. Três pesquisadores analisaram de maneira independente 10 imagens de cada órgão em nove categorias: secreção apócrina, esferocristais, eliminação de fragmentos celulares, mudanças na borda estriada, vacuolização, dilatação celular, danos em ninhos das células regenerativas, perda de contato celular e picnose nuclear. De acordo com a intensidade das características acima, foram atribuídas as seguintes pontuações: 0 para nenhuma ocorrência, 2 para baixa ocorrência, 4 para ocorrência moderada e 6 para alta ocorrência. Após isso, foi calculada a média de cada característica com os valores atribuídos por cada pesquisador e, após, uma média com todas as 10 imagens do órgão, caracterizando o dano médio desse. Cada categoria possui um nível de significância baseado na sua capacidade de reversibilidade. O somatório de cada nível de significância multiplicado pelo dano médio de cada categoria resultou no índice de lesão do órgão. Todo o cálculo do índice de lesão foi feito baseado na metodologia previamente estabelecida para abelhas por Grella *et al.* (2019).

## **2.6. Bioensaio de comportamento**

Para avaliação das possíveis alterações comportamentais, foram utilizadas placas de Petri (9 cm de diâmetro x 2 cm de altura) contendo cinco operárias de uma mesma colônia em cada placa, para cada uma das quatro colônias advindas do tratamento de CL<sub>50</sub> e controle (40 indivíduos totais). O comportamento foi registrado por 15 minutos (censurando posteriormente na edição os primeiros 2,5 minutos e os últimos 2,5 minutos de vídeo, para remover da análise o período de aclimatação das abelhas nas placas) com uma câmera de vídeo digital (30 quadros por segundo) sob luz artificial vermelha (com intuito de reduzir o efeito de fototropismo nas abelhas), a 25 °C ± 2. Os vídeos foram analisados com o software Ethoflow® (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI, Brasil, BR 512020 000737-6) sendo avaliadas a distância percorrida (cm) e a velocidade média (cm s<sup>-1</sup>) (Bernardes et al., 2021) de cada uma das forrageiras.

## **2.7. Respirometria**

A taxa de troca de gasosa, ou taxa de respiração, foi registrada para abelhas adultas forrageiras após a exposição aos tratamentos de controle e de CL<sub>50</sub>, conforme descrito anteriormente para os bioensaios de mortalidade. Quatro réplicas de 24 forrageiras (oito abelhas de cada uma das três colônias, divididas para o tratamento e controle) foram acomodadas à câmaras de 3,5 mL conectadas a um sistema totalmente fechado, no qual a produção de dióxido de carbono (µL CO<sub>2</sub> /h) foi transferida para o leitor de infravermelho por meio da injeção de corrente de ar livre de CO<sub>2</sub> no sistema (por 2 minutos a uma taxa de fluxo de 400 mL/min). Para isso, foi utilizado respirômetro diferencial TR3C equipado

com um analisador de CO<sub>2</sub> (Sable Systems, Las Vegas, EUA), e as determinações foram realizadas a 25 °C (protocolo adaptado de Guedes *et al.*, (2006)).

## **2.8. Análises estatísticas**

Para a quantificação histoquímica e índice de lesão do intestino médio, os dados foram previamente submetidos a testes de homogeneidade de variância de Levene e normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Os dados dos testes histoquímicos e os do índice de lesão de órgãos foram submetidos ao teste T de Student. Cada característica do índice de lesão também foi avaliada e submetida ao teste de Mann-Whitney nas amostras não paramétricas e teste T nas paramétricas. A seguir, os dados foram submetidos ao teste *post-hoc* de Bonferroni.

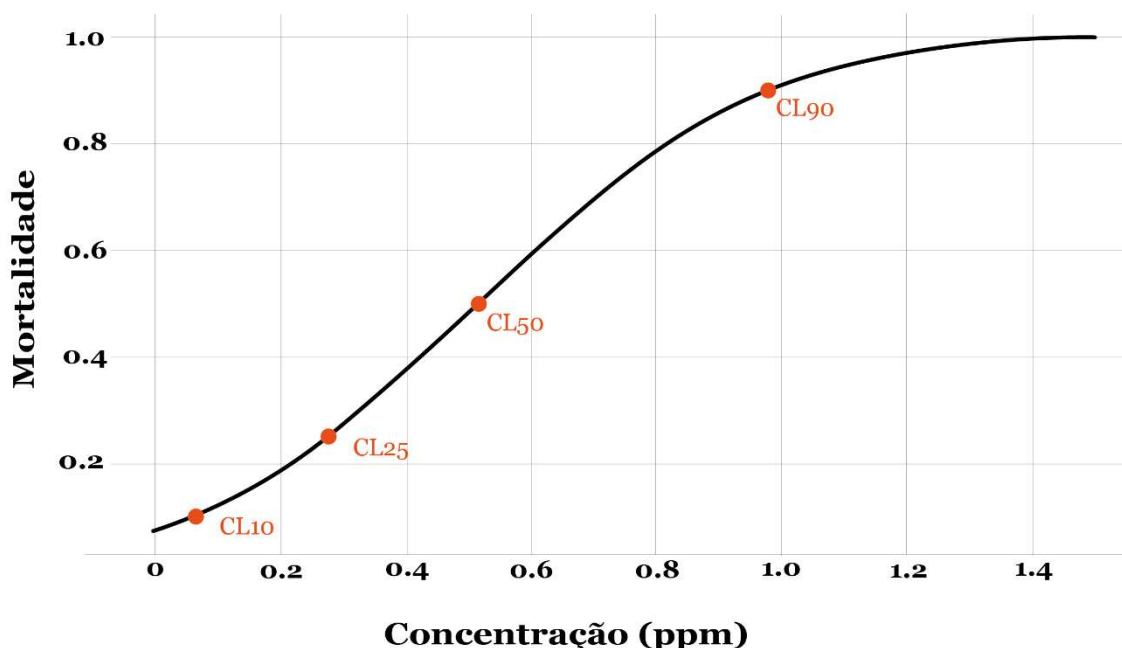
Os dados de respirometria e de comportamento foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Levene para verificar a normalidade e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Os dados de respirometria foram ajustados em Modelo Linear com distribuição Gaussiana e as diferenças observadas pela Análise de Variância. Para os dados de comportamento (distância percorrida e velocidade média) foi ajustado um Modelo Linear Generalizado com distribuição Gamma e as diferenças observadas pelo teste T de Student.

Todos os testes foram realizados no software RStudio 4.4.0 com nível de significância de 5%.

### 3. Resultados

#### 3.1. Bioensaio de concentração-mortalidade

A análise Probit revelou que o modelo de concentração-mortalidade foi adequado ( $\chi^2 = 179.7259$ ,  $gl = 4$ , Intercepto =  $-1.455$ ,  $p > 0,05$ ) e permitiu a estimativa das concentrações letais de clorpenafir para *P. helleri*, confirmando a toxicidade deste inseticida para abelhas forrageiras desta espécie (Figura 1). A CL<sub>50</sub> utilizada para os experimentos seguintes foi estimada em 0.52 ppm.

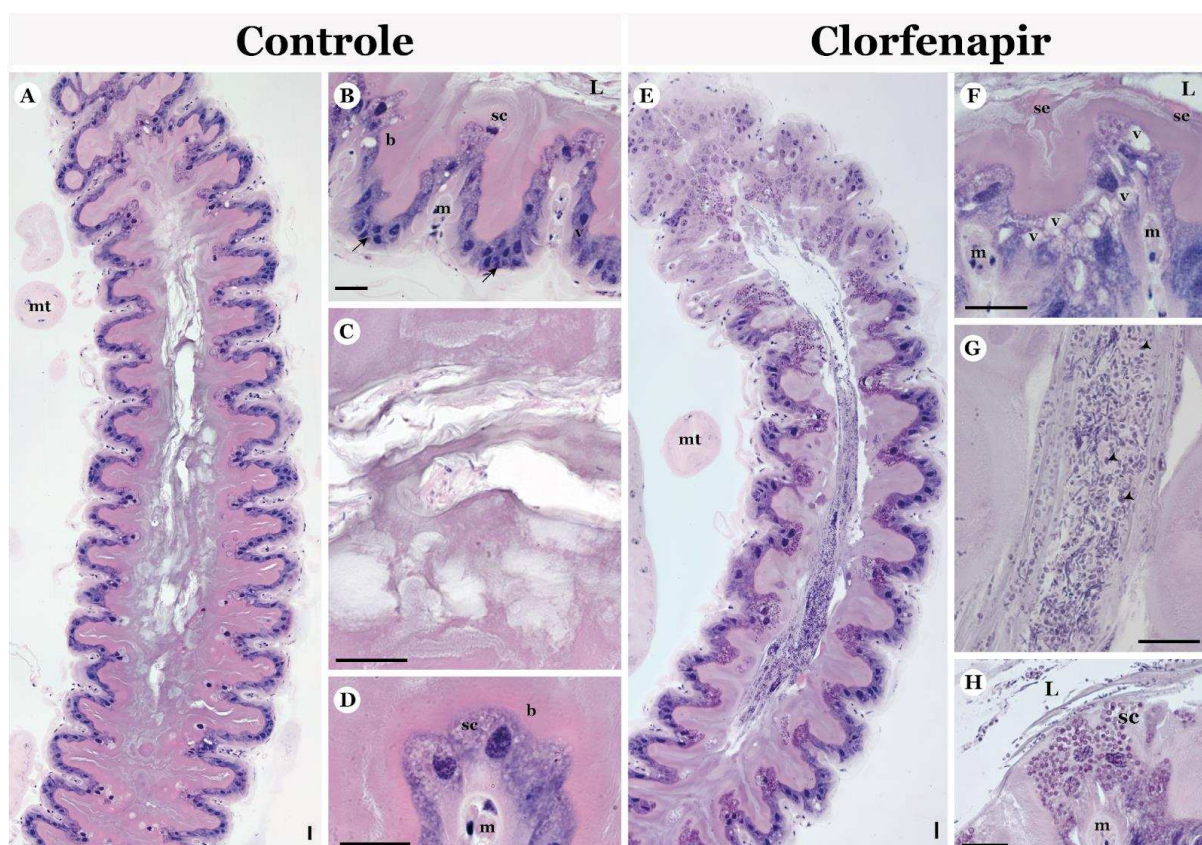


**Figura 1.** Análise de Probit correlacionando a probabilidade de morte e a concentração de clorfenapir (ppm). ( $\chi^2 = 179.7259$ ,  $gl = 4$ , Intercepto =  $-1.455$ ,  $p > 0,05$ ).

#### 3.2. Histopatologia

O intestino médio dos indivíduos controle de *P. helleri* apresenta um epitélio com células digestivas colunares com cromatina descondensada e a presença de esferocristais no citoplasma (Fig. 2A, 2B, 2D), borda estriada apical bem desenvolvida e uniforme, além de ser nítida a presença de ninhos celulares na base do tecido (Fig. 2B). Várias camadas de matriz peritrófica estão presentes no lúmen (Fig. 2C).

As abelhas expostas ao clorfenapir por 3h apresentaram danos histopatológicos. O epitélio absorptivo apresentou alta vacuolização citoplasmática (Fig. 2F) e esferocristais sendo liberados no lúmen (Fig. 2H). Neste, também foi possível observar a presença de secreção apócrina e fragmentos celulares, apesar de não ser possível observar alterações na matriz peritrófica (Fig. 2G).



**Figura 2-** Micrografias de luz do intestino médio de *Partamona helleri* (Hymenoptera : Apidae) tratada com clorfenapir. A. Estrutura geral do intestino médio em abelhas do controle. B. Detalhe do epitélio intestinal apresentando esferocristais (sc) e ninhos regenerativos (seta). C. Detalhe matriz peritrófica. D. Esferocristais (sc) contidos dentro das células. Borda estriada (b) eosinofílica. E. Estrutura geral do intestino médio em animais tratados com clorfenapir. F. Detalhe do epitélio intestinal apresentando vacúolos citoplasmáticos proeminentes (v) e secreções apócrinas (se). G. Detalhe do lúmen com as camadas de matriz peritrófica e fragmentos celulares (ponta de seta). H. Esferocristais (sc) sendo liberados em direção ao lúmen (L). m - músculo, mt - túbulos de Malpighi. Barra de escala 20µm.

### **3.3. Histoquímica**

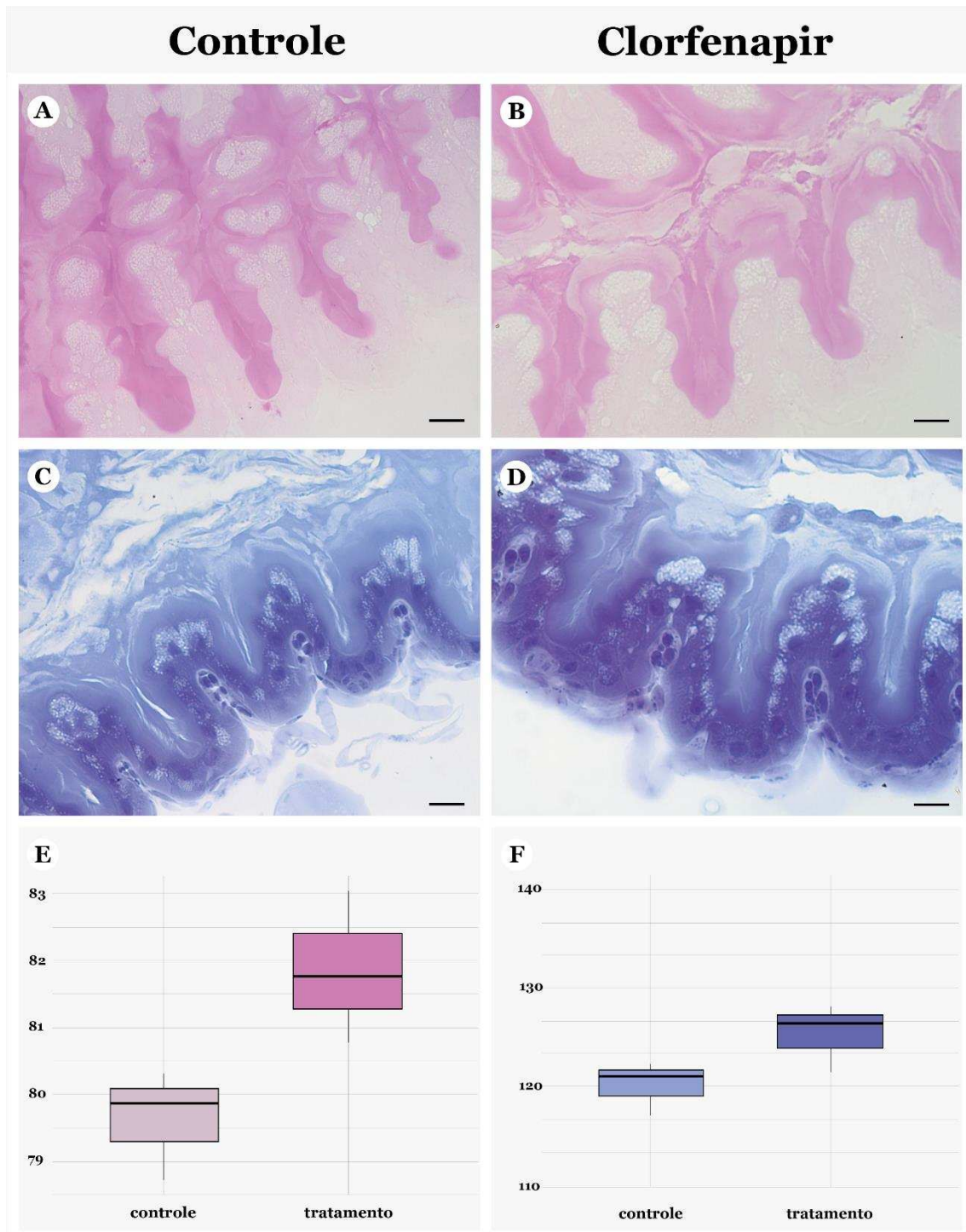
A quantificação das técnicas histoquímicas não demonstrou diferenças na intensidade das reações nas células digestivas e na borda estriada entre os intestinos médios das abelhas do controle e do tratamento com (Fig. 3A-F).

### **3.4. Índice de lesão**

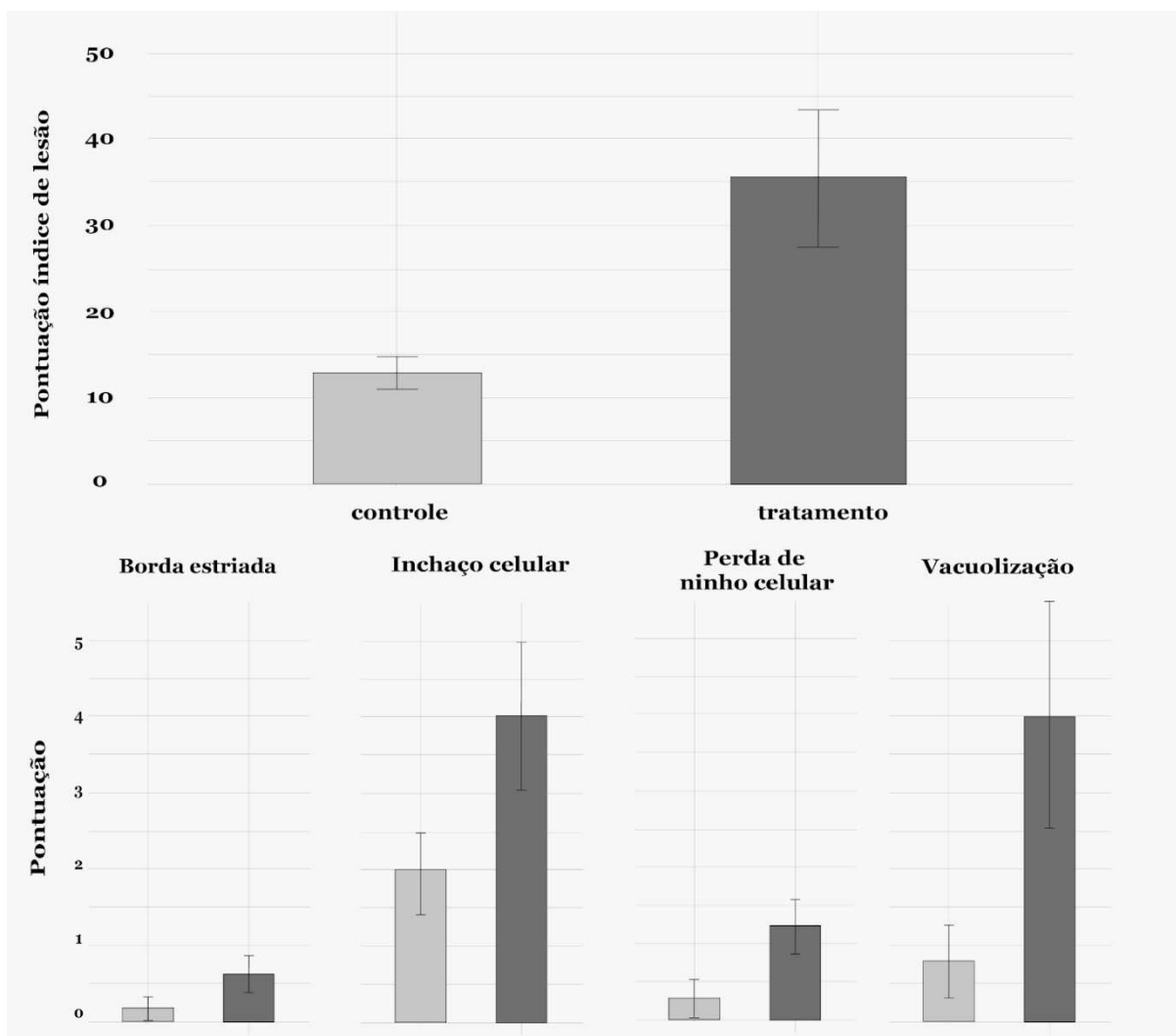
Abelhas expostas ao clorfenapir apresentaram maiores índices de lesão em comparação àquelas abelhas não expostas ao pesticida (Fig. 4;  $p = 0.008$ ). Quando avaliados separadamente, os seguintes parâmetros apresentaram maiores ocorrências no epitélio do intestino médio de abelhas expostas ao clorfenapir: danos na borda estriada ( $p = 0.02$ ), dilatação celular ( $p = 0.01$ ), perda de ninho de células regenerativas ( $p < 0.01$ ) e vacuolização citoplasmática ( $p = 0.02$ ).

### **3.5. Bioensaio de comportamento**

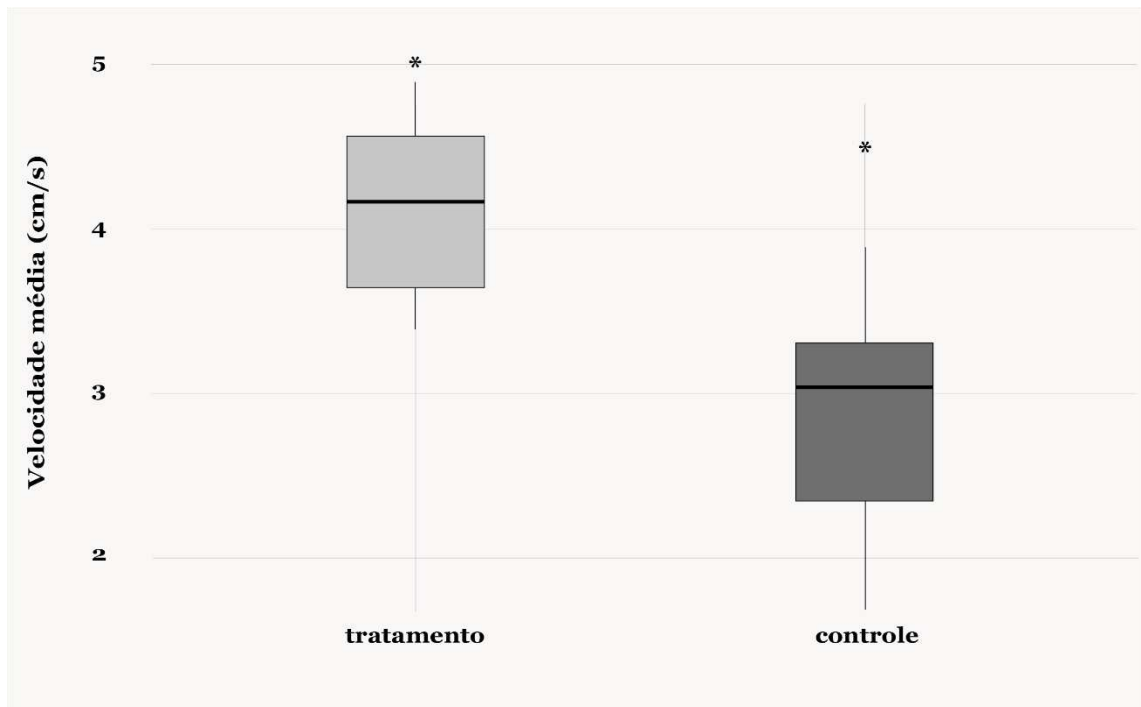
As operárias de *P. helleri* expostas ao clorfenapir apresentaram diferença na locomoção em relação ao controle. As abelhas expostas ao clorfenapir apresentaram maior velocidade média (estimada = 0.11236, EP = 0.02045,  $t = 5.496$ ,  $p > 0.01$ ) e um aumento na distância percorrida (estimada = 1.872e-04, EP = 3.405e-05,  $t = 5.498$ ,  $p < 0.01$ ) quando comparadas com aquelas do controle (Figs. 5 e 6).



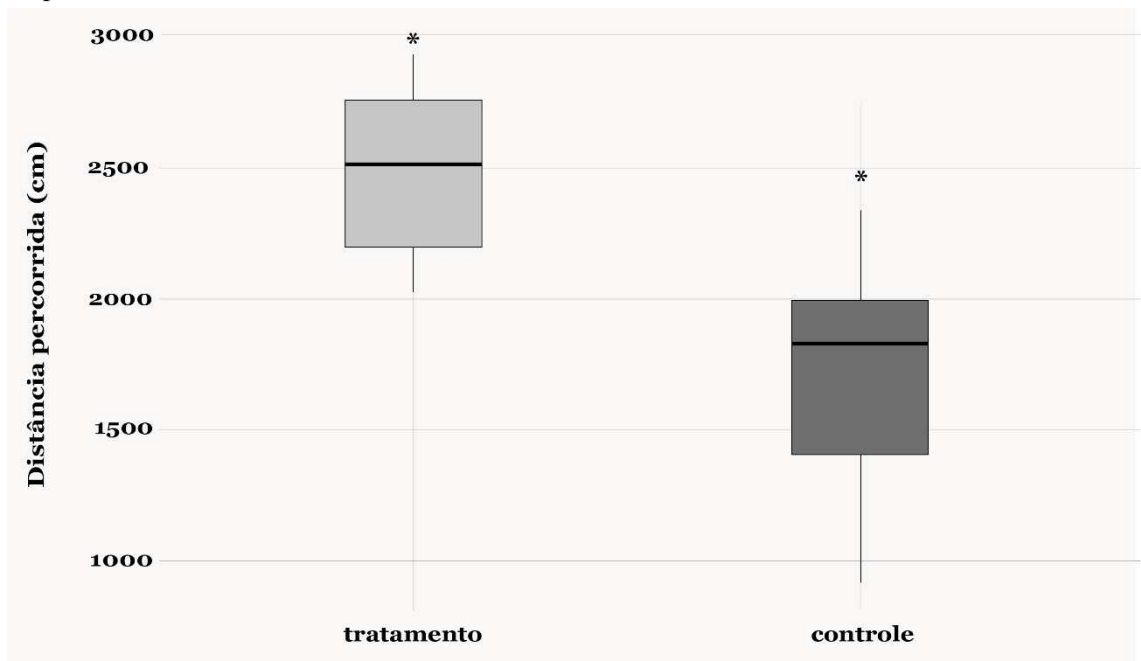
**Figura 3. Histoquímica do intestino médio de *Partamona helleri* (Hymenoptera : Apidae) tratada com clorfenapir. A-B. Teste de carboidratos entre grupo controle e tratamento. C-D. Teste para proteínas entre os grupos controle e tratamento. E. Intensidade de reação positiva para P.A.S. ( $p=0.06$ ). F. Intensidade de reação positiva para mercúrio bromofenol ( $p=0.11$ ). Não houve diferença significativamente estatística entre abelhas do controle e tratamento para ambas as técnicas. Barra de escala 20 $\mu$ m.**



**Figura 4. Índice de lesão no epitélio do intestino médio de *Partamona helleri*. (Hymenoptera : Apidae)** Em A, está sendo exibido o índice de lesão total do intestino médio ( $p < 0.01$ ). Em B, estão sendo exibidos a diferença do índice de lesão da borda estriada ( $p = 0.02$ ), dilatação celular ( $p = 0.01$ ), perda de ninho de células regenerativas ( $p < 0.01$ ) e vacuolização citoplasmática ( $p = 0.02$ ). O tratamento de  $CL_{50}$  apresentou maior índice de lesão para todas as variáveis analisadas. Controle (cinza) e Tratamento de  $CL_{50}$  (preto).



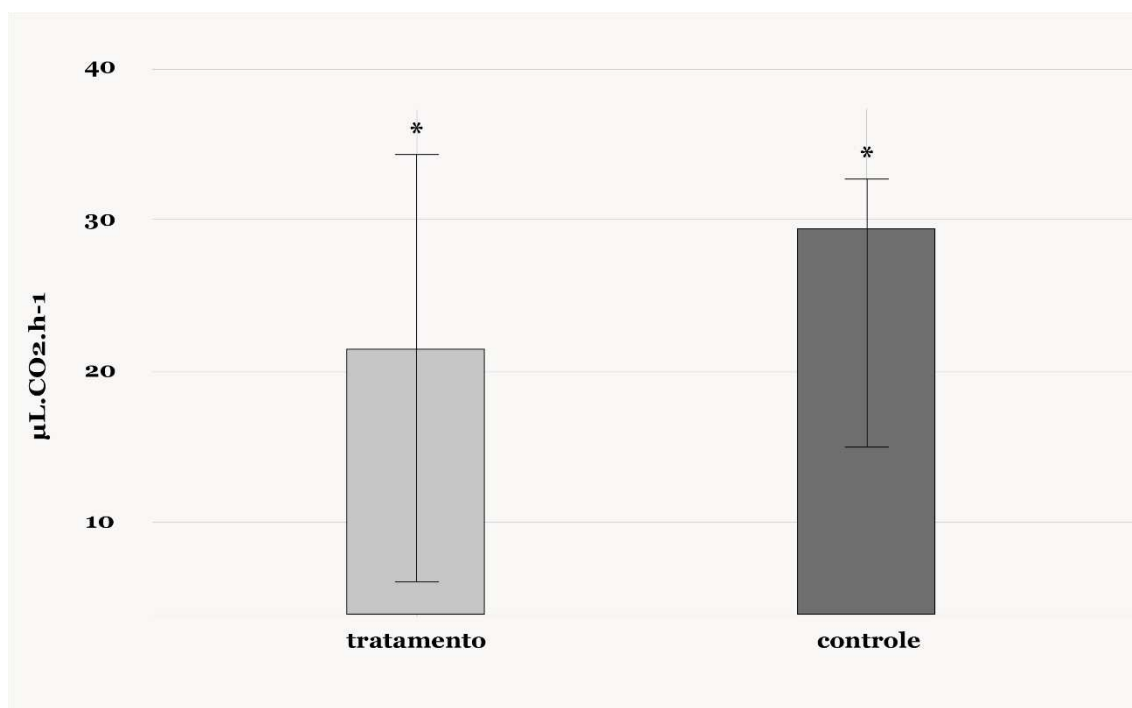
**Figura 5. Bioensaio de comportamento.** Velocidade média de caminhada (cm/s) de *Partamona helerri* nos grupos controle (CTRL) e exposto ao clorfenapir (CL<sub>50</sub>). O tracejado dentro das boxes representa as médias dos tratamentos. \* indica diferença estatística entre as médias teste T de Student ( $p < 0,001$ ).



**Figura 6 Bioensaio de comportamento.** Distância percorrida de caminhada (cm) de *Partamona helerri* (Hymenoptera : Apidae) nos grupos controle (CTRL) e exposto ao clofernapir (CL<sub>50</sub>). O tracejado dentro das boxes representa as médias dos tratamentos. \* indica diferença estatística entre as médias teste T de Student ( $p < 0,001$ ).

### 3.6. Respirometria

O experimento de respirometria revelou diminuição na taxa respiratória nas operárias expostas ao clorfenapir, quando comparado aos indivíduos do controle (Estimado = 9.028, EP = 3.471, t value = 2.601, p = 0.0163; Fig. 7).



**Figura 7.** Taxa de respiração (média ± dp) de *Partamona helleri* (Hymenoptera : Apidae) no controle e após exposição ao clorfenapir (CL<sub>50</sub>). \* indica diferença estatística entre as médias (p = 0,016) calculado pela análise de variância (ANOVA).

## 4. DISCUSSÃO

O inseticida clorfenapir se mostrou tóxico para a abelha sem ferrão *P. helleri*, apresentando alto potencial letal, mesmo em concentrações inferiores às aquelas recomendadas em campo para o controle do fitófago *T. absoluta*. Este achado é importante, principalmente quando somado ao fato de que este pesticida possui meia vida ambiental média de um ano (Huang *et al.*, 2023), sendo então persistente em campo, gerando uma contaminação à longo prazo que pode contribuir com o declínio populacional desta abelha nativa. A toxicidade de clorfenapir foi reportada para *A. mellifera*

(Costa *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018), porém, este é o primeiro estudo que define as concentrações letais deste pesticida para uma abelha nativa. Além disso, a CL<sub>50</sub> de clorfenapir de 0.52 ppm para forrageiras adultas de *P. helleri*, é menor do que um terço daquela encontrada para o alvo, *T. absoluta* (CL<sub>50</sub> = 1,87 ppm, capítulo 1), indicando que a utilização do pesticida para controle da praga, afetaria *P. helleri* presentes ou nas proximidades da cultura.

Quando avaliados os danos causados pelo inseticida no intestino médio de *P. helleri*, foi evidenciado dano severo em alguns parâmetros quando comparados ao intestino médio de abelhas não expostas, como alto nível de vacuolização citoplasmática, que tem sido considerado indicativo de morte celular por autofagia em abelhas expostas a pesticidas (Carneiro *et al.*, 2022). Também foi observada grande liberação de esferocristais no lúmen intestinal, é uma resposta comum em abelhas quando em contato com xenobióticos, visto que esta liberação é um mecanismo de tentativa de restabelecimento do equilíbrio osmótico quando há dano celular ou mesmo extravasamento de conteúdo (Cruz-Landim, 2008). Além disso, o clorfenapir causa aumento na secreção apócrina e na liberação de fragmentos celulares para o lúmen do intestino médio, características associadas a danos celulares severos no intestino médio das abelhas, além de ser indicativo de ativação de vias de morte celular apoptótica (Cruz-Landim, 2008; Cruz *et al.*, 2010). A extensão dos danos no intestino médio aponta para uma desestruturação e comprometimento das funções digestivas do órgão, e apesar de haver a possibilidade de reposição de células epiteliais do intestino médio por outras células advindas dos ninhos de células regenerativas (Forkpah *et al.*, 2014), também

foram encontrados danos e perda destas células, sugerindo irreversibilidade do processo de perda celular (Grella *et al.*, 2019). Não foram encontradas evidências de danos à matriz peritrófica, estrutura comumente afetada quando há intoxicação por xenobióticos (Grella *et al.*, 2019). É possível que não tenha sido encontrado danos nesta estrutura devido ao período de experimentação de 24 horas, visto que é comum verificar tais danos em exposições mais longas aos à pesticidas (Serra *et al.*, 2023).

Os testes histoquímicos para evidenciação de carboidratos (PAS) e proteínas (mercúrio bromofenol) não revelam diferenças no intestino médio entre as abelhas expostas ao clorfenapir e controle. Em intestinos médios de *A. mellifera* expostas ao pesticida ciflumetofeno (interruptor da cadeia transportadora de elétrons, assim como clorfenapir) por 24 horas também não foram encontradas diferenças para os testes de PAS e mercúrio de bromofenol, e apenas após 48 horas foi verificada redução proteica através do teste de mercúrio de bromofenol (Reis *et al.*, 2024). É possível que resultados semelhantes fossem encontrados nos intestinos de *P. helleri* em uma exposição letal de 48 horas, ou mesmo em uma exposição crônica de maior tempo, como encontrado em *A. mellifera* expostas ao pesticida azoxistrobina (Serra *et al.*, 2023) e ao ciflumetofeno (Reis *et al.*, 2024).

O índice de lesão do órgão revela a ocorrência de danos no intestino médio de operárias expostas a  $CL_{50}$  de clorfenapir, confirmando a alta toxicidade do inseticida para o intestino médio de *P. helleri*. O índice de lesão é um bom indicativo para avaliar a irreversibilidade dos danos causados e a extensão dos mesmos de forma semi-quantitativa, auxiliando uma categorização correta e minuciosa dos locais afetados e da

extensão dos danos causados (Grella *et al.*, 2019). Desta forma, a extensão dos danos avaliados pelo índice de lesão total, indicam grau irreversível de comprometimento funcional do intestino médio em operárias de *P. helleri*. Quando avaliados os parâmetros específicos, é evidenciada ocorrência de danos significativos na borda estriada, dilatação celular e vacuolização citoplasmática ocasionados pelo clorfenapir. Estes resultados confirmam a hipótese de toxicidade do inseticida ao intestino médio destas abelhas e a verificação de um incremento no índice de lesão dos ninhos de células regenerativas nas abelhas tratadas é um indicativo relevante de irreversibilidade dos danos celulares e teciduais.

O bioensaio comportamental apontou maior agitação e estresse nas abelhas do tratamento com clorfenapir quando comparadas ao controle. As abelhas intoxicadas com clorfenapir apresentam maior velocidade média e distância percorrida, indicando maior agitação e estresse, comportamento condizente com o esperado, visto que *P. helleri* apresentam comportamento agressivo para defesa da colônia (Camargo & Pedro, 2003). Aumento de distância percorrida ocorre em forrageiras adultas de *P. helleri* expostas a fipronil (inseticida de ação neurotóxica; Farder-Gomes *et al.*, 2021b), possivelmente devido ao excesso de atividade neuronal acarretada pelo pesticida, sugerindo que o aumento da distância percorrida aqui encontrado esteja relacionado à danos neurais causados pela exposição ao clorfenapir. Estas alterações comportamentais podem ser consideradas como efeitos subletais da exposição ao inseticida, mesmo em uma exposição aguda e de curta duração, sendo razoável extrapolar que o quadro das abelhas se agrave com o tempo de exposição, diminuindo a probabilidade de sobrevivência, visto que

efeitos sub-letais no comportamento que levam à morte ou disfuncionalidade estão amplamente descritos em literatura (Fischer *et al.*, 2014; Pudasaini, 2020; Farder-Gomes *et al.*, 2021b; Bernardes *et al.*, 2022) . Além disso, a maior agitação das abelhas poderia acarretar no carregamento de resíduos do pesticida para a colônia, podendo levar a intoxicação e a biomagnificação do pesticida nestas colônias (Devillers & Pham-Delègue, 2002; Sanchez-Bayo & Goka, 2016), representando um dano ecológico e econômico grave, visto que pesticidas de alta persistência podem ser carregados para a colônia pelas adultas e prejudicarem o desenvolvimento larval de novas abelhas (Carneiro *et al.*, 2023), levando ao colapso da colônia.

O bioensaio de respirometria mostra diminuição na taxa respiratória de *P. helleri* expostas ao clorfenapir quando comparado aos indivíduos do controle, como para a barata *Blattella germanica* (Black *et al.*, 1994). É esperado que as abelhas de *P. helleri* exibam diminuição da taxa metabólica, visto que o mecanismo de ação do clorfenapir consiste em diminuir a atividade protomotriz na matriz mitocondrial, além de se ligar e inviabilizar os elementos da cadeia transportadora de elétrons, resultando em uma diminuição acentuada de energia química celular, portanto, diminuindo a quantidade de recursos disponibilizados para o processo de respiração celular e conseguinte menor acúmulo e mobilização de CO<sub>2</sub> dos indivíduos intoxicados com o pesticida (Huang *et al.*, 2023). É importante notar que a alta desestruturação intestinal encontrada nas abelhas intoxicadas, pode resultar em um aporte energético menor, devido a incapacidade de absorção do alimento, e desta forma, há um déficit energético, e portanto, menor taxa de respiração celular, direto (interrupção da atividade respiratória à nível de substrato) e indireto (menor

obtenção energética devido aos danos da estrutura intestinal). Além disso, sabe-se que dano mitocondrial é outro mediador de morte celular por apoptose em insetos (Huang *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2022), suportando nossos achados de possível morte celular no epitélio intestinal das abelhas intoxicadas.

Por fim, nossos dados mostram que o clorfenapir causa danos irreversíveis ao intestino médio, causa agitação e estresse e diminui a atividade respiratória de operárias de *P. helleri*, que, portanto, estão em perigo ecotoxicológico. Provavelmente, toda a tribo Meliponini, está ameaçada pelo uso deste inseticida altamente tóxico e persistente. A extensão dos danos do clorfenapir em termos ecológicos pode estar sendo subestimada e as perdas ecológicas e agrícolas negligenciadas, sendo necessária a revisão do uso deste pesticida.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascher, J. S., & Pickering, J. (2022). Discover Life bee species guide and world checklist (Hymenoptera: Meliponini).
- Bancroft, J.D. and Gamble, M. (2008). Theory and practice of histological techniques. London, Churchill Livingstone.
- Bernardes, R. C., Lima, M. A. P., Guedes, R. N. C., da Silva, C. B., & Martins, G. F. (2021). Ethoflow: computer vision and artificial intelligence-based software for automatic behavior analysis. *Sensors*, 21(9), 3237.
- Bernardes, R. C., Botina, L. L., da Silva, F. P., Fernandes, K. M., Lima, M. A. P., & Martins, G. F. (2022). Toxicological assessment of agrochemicals on bees using machine learning tools. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127344.
- Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahli T (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. of Fish Dis.* 22:25-34.
- Black, B. C., Hollingworth, R. M., Ahammadsahib, K. I., Kukel, C. D., & Donovan, S. (1994). Insecticidal action and mitochondrial uncoupling activity of AC-303,630 and related halogenated pyrroles. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 50(2), 115-128.
- Botina, L. L., Bernardes, R. C., Barbosa, W. F., Lima, M. A. P., Guedes, R. N. C., & Martins, G. F. (2020). Toxicological assessments of agrochemical effects on stingless bees (Apidae, Meliponini). *MethodsX*, 7, 100906.
- Botina, L. L., Barbosa, W. F., Acosta, J. P. L., Bernardes, R. C., Cortes, J. E. Q., Pylro, V. S., ... & Martins, G. F. (2023). The impact of early-life exposure to three

- agrochemicals on survival, behavior, and gut microbiota of stingless bees (*Partamona helleri*). *Environmental Science and Pollution Research*, 30(27), 70143-70158.
- Dos Santos, C. F., Otesbelgue, A., & Blochtein, B. (2018). The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PLoS One*, 13(7), e0200286.
- Butler, C., & Oluoch-Kosura, W. (2006). Linking future ecosystem services and future human well-being. *Ecology and Society*, 11, 1-16.
- Brown, J. C., & Albrecht, C. (2001). The effect of tropical deforestation on stingless bees of the genus *Melipona* (Insecta: Hymenoptera: Apidae: Meliponini) in central Rondonia, Brazil. *Journal of Biogeography*, 28(5), 623-634.
- Carneiro, L. S., Martinez, L. C., De Oliveira, A. H., Cossolin, J. F. S., De Resende, M. T. C. S., Gonçalves, W. G., ... & Serrão, J. E. (2022). Acute oral exposure to imidacloprid induces apoptosis and autophagy in the midgut of honey bee *Apis mellifera* workers. *Science of the Total Environment*, 815, 152847.
- Carneiro, L. S., Santos, C. G., de Resende, M. T. C. S., de Souza, D. L. L., dos Santos Souza, D., da Cruz Souza, A. M., ... & Serrão, J. E. (2023). Effects of the insecticide imidacloprid on the post-embryonic development of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Science of the Total Environment*, 905, 167278.
- Costa, E. M., Araujo, E. L., Maia, A. V., Silva, F. E., Bezerra, C. E., & Silva, J. G. (2014). Toxicity of insecticides used in the Brazilian melon crop to the honey bee *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Apidologie*, 45, 34-44.

- Carvalho, C. A. L. D., Marchini, L. C., & Ros, P. B. (1999). Fontes de pólen utilizadas por *Apis mellifera* L. e algumas espécies de Trigonini (Apidae) em Piracicaba (SP). *Bragantia*, 58, 49-56.
- Camargo, J. M., & Pedro, S. R. (2003). Meliponini neotropicais: o gênero *Partamona* Schwarz, 1939 (Hymenoptera, Apidae, Apinae)-bionomia e biogeografia. *Revista brasileira de Entomologia*, 47, 311-372.
- Chapman, R. F. (1998). *The insects: structure and function*. Cambridge university press.
- Chen, X., Zheng, J., Teng, M., Zhang, J., Qian, L., Duan, M., ... & Wang, C. (2021). Bioaccumulation, metabolism and the toxic effects of chlorfenapyr in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(29), 8110-8119.
- Cruz, A. D. S., Elaine, C., Da Silva-zacarin, M., Bueno, O. C., & Malaspina, O. (2010). Morphological alterations induced by boric acid and fipronil in the midgut of worker honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae. *Cell Biology and Toxicology*, 26(2), 165.
- Cruz-Landim, C. (2009). Abelhas: Morfologia e função de sistemas. São Paulo, Editora Unesp.
- Daily, G. C., & Matson, P. A. (2008). Ecosystem services: From theory to implementation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(28), 9455-9456.
- Denecke, S., Swevers, L., Douris, V., & Vontas, J. (2018) How do oral insecticidal compounds cross the insect midgut epithelium? *Insect biochemistry and molecular biology* 103, 22–35.

Devillers, J., & Pham-Delègue, M. H. (Eds.). (2002). Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals. CRC Press.

Domingues CE, Inoue LV, Silva-Zacarin EC, Malaspina O (2020) Foragers of Africanized honeybee are more sensitive to fungicide pyraclostrobin than newly emerged bees. Environ. Pollut. 226:1-12.

Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2021a). Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). Science of the Total Environment, 774, 145679.

Farder-Gomes, C. F., Fernandes, K. M., Bernardes, R. C., Bastos, D. S. S., de Oliveira, L. L., Martins, G. F., & Serrão, J. E. (2021b). Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini). Science of the Total Environment, 794, 148678.

Ferreira, K. M. (2011). A colonização de uma área por espécies de abelhas sem ferrão. Um Estudo de Caso: *Partamona helleri* (Friese, 1900)(Hymenoptera: Apidae: Meliponini).

Fischer, J., Müller, T., Spatz, A. K., Greggers, U., Grünewald, B., & Menzel, R. (2014). Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. PloS one, 9(3), e91364.

- Forkpah, C., Dixon, L. R., Fahrbach, S. E., & Rueppell, O. (2014). Xenobiotic effects on intestinal stem cell proliferation in adult honey bee (*Apis mellifera* L) workers. *PLoS One*, 9(3), e91180.
- Fu, B., Wang, S., Su, C., & Forsius, M. (2013). Linking ecosystem processes and ecosystem services. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 5(1), 4-10.
- Grella T, Soares-Lime H, Malaspina O, Nocelli R (2019) Semi-quantitative analysis of morphological changes in bee tissues: A toxicological approach. *Chemosphere*
- Guedes, R. N. C., Oliveira, E. E., Guedes, N. M. P., Ribeiro, B., & Serrão, J. E. (2006). Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiological Entomology*, 31(1), 30-38.
- Jin, M., Liao, C., Chakrabarty, S., Wu, K., & Xiao, Y. (2019). Comparative proteomics of peritrophic matrix provides an insight into its role in Cry1Ac resistance of cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Toxins*, 11(2), 92.
- 236:1-5
- Kerr, W. E., Zilse, G. A. C., & Nascimento, V. A. (1996). Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação
- Kumar, D., Banerjee, D., Chakrabarti, P., Sarkar, S., & Basu, P. (2022). Oxidative stress and apoptosis in Asian honey bees (*A. cerana*) exposed to multiple pesticides in intensive agricultural landscape. *Apidologie*, 53(2), 25.
- Huang, J., Lv, C., Hu, M., & Zhong, G. (2013). The mitochondria-mediate apoptosis of Lepidopteran cells induced by azadirachtin. *PLoS One*, 8(3), e58499.

- Huang, P., Yan, X., Yu, B., He, X., Lu, L., & Ren, Y. (2023). A Comprehensive Review of the Current Knowledge of Chlorfenapyr: Synthesis, Mode of Action, Resistance, and Environmental Toxicology. *Molecules*, 28(22), 7673.
- Lopes, I. S., Zonaro, L. D., Calvalcante, M., dos Santos, T. C., de Melo Silva, P., de Oliveira Legendre, A., & Talmoni, J. L. B. (2018). Agrotóxicos: a ameaça de extinção das abelhas no Brasil. Júnior, LM, Stevens, D., Purini, SR de M., Magnoni, M. da GM, Vale, JMF do, Júnior, GAB, Filho, EFA, Silva, WTL da, & Figueiredo, W. dos S.(Orgs.). Programa Educativo e Social JC na Escola: Ciência Alimentando o Brasil. São Paulo: Centro Paula Souza, 95-110.
- Matias, D. M. S., Leventon, J., Rau, A. L., Borgemeister, C., & von Wehrden, H. (2017). A review of ecosystem service benefits from wild bees across social contexts. *Ambio*, 46(4), 456-467.
- Oliveira, A. H., Fernandes, K. M., Gonçalves, W. G., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2019). A peritrophin mediates the peritrophic matrix permeability in the workers of the bees *Melipona quadrifasciata* and *Apis mellifera*. *Arthropod structure & development*, 53, 100885.
- Pudasaini, R. (2020). Behavioral changes due to sub-lethal doses of pesticides in bees. *J. Entomol*, 17, 84-92.
- Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2016). Impacts of pesticides on honey bees. *Beekeeping and bee conservation-advances in research*, 4, 77-97.
- Schoonhoven LM, Van Loon JJ, e Dicke, M. *Insect-plant biology*. Oxford University Press on Demand (2005).

- Serra, R. S., Martínez, L. C., Cossolin, J. F. S., Resende, M. T. C. S. D., Carneiro, L. S., Fiaz, M., & Serrão, J. E. (2023). The fungicide azoxystrobin causes histopathological and cytotoxic changes in the midgut of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Ecotoxicology*, 32(2), 234-242.
- Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., S.K. Kohli, P., Yadav, A.S., Bali, R.D., Parihar, O.I., Dar, K., Singh, S., Jasrotia, P., Bakshi, M., Ramakrishnan, S., Kumar, R., Bhardwaj, & Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, 1, 1-16.
- Stefanini, M., Martino, C. D., & Zamboni, L. (1967). Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216(5111), 173-174.
- Urstadt KR (2022) Staining intensity quantification protocol.
- Wang, Z., Cang, T., Wu, S., Wang, X., Qi, P., Wang, X., & Zhao, X. (2018). Screening for suitable chemical acaricides against two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae*, on greenhouse strawberries in China. *Ecotoxicology and environmental safety*, 163, 63-68.
- Warner, S., Pokhrel, L. R., Akula, S. M., Ubah, C. S., Richards, S. L., Jensen, H., & Kearney, G. D. (2023). A scoping review on the effects of Varroa mite (*Varroa destructor*) on global honey bee decline. *Science of The Total Environment*, 167492.
- Wood, T. J., Michez, D., Paxton, R. J., Drossart, M., Neumann, P., Gerard, M., ... & Vereecken, N. J. (2020). Managed honey bees as a radar for wild bee decline?. *Apidologie*, 51, 1100-1116.

Xu, X., Wang, X., Yang, Y., Ares, I., Martínez, M., Lopez-Torres, B., ... & Martinez, M.

A. (2022). Neonicotinoids: mechanisms of systemic toxicity based on oxidative stress-mitochondrial damage. *Archives of Toxicology*, 96(6), 1493-1520.

## CONCLUSÃO FINAL

Apesar dos resultados promissores no controle da praga *T. absoluta*, o inseticida clorfenapir demonstrou alto grau de perigo ecotoxicológico devido aos efeitos letais e subletais encontrados no intestino médio, análises comportamentais e fisiologia da abelha sem ferrão *P. helleri*. Os resultados sugerem que o uso deste pesticida na cultura do tomate seja banido, assim como em países da Europa e nos Estados Unidos da América. Nenhum benefício econômico individual deve prevalecer acima da sustentabilidade ambiental e dos serviços ecossistêmicos, que são de usufruto geral para esta geração e para as vindouras.